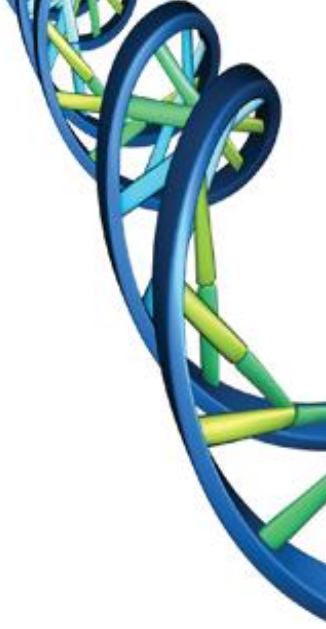


Bedienungsanleitung für den SURVEYOR® Scan *KRAS* Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* mit dem WAVE® *MCE* System

CE IVD

Bitte lesen Sie diese Bedienungsanleitung sorgfältig durch, bevor Sie dieses Produkt verwenden.

Heben Sie diese Bedienungsanleitung für zukünftige Informationen auf.

Transgenomic®
Advancing Personalized Medicine

Diese Seite ist absichtlich leer

Inhaltsverzeichnis

Hersteller 2
SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* mit dem WAVE MCE System 2
Verwendungszweck 2
Angaben zum Gebrauch 2
Testprinzip des SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Assay 3
KRAS 3
SURVEYOR Nuclease 3
Rückverfolgbarkeit der Kit-Kontrollen 5
Kit-Komponenten 5
Anzahl der Proben, die mit dem Kit getestet werden können 6
DNA-Sequenzierung 6
Zusätzlich erforderliche Ausrüstung und Reagenzien 6
Reagenzienvorbereitung 7
Lagerung und Haltbarkeit 7
Warnhinweise & Vorsichtsmaßnahmen 7
Primäre Probenentnahme, Handhabung und Lagerung 7
Testverfahren 8
Somatischer Mutationsnachweis mit SURVEYOR Scan Kits – Ein Überblick 8
Setup/Kalibrierung des WAVE *MCE* Systems 8
Überlegungen vor Beginn der *KRAS* Probenanalyse 9
Überlegungen zu den Matrizen 9
Primerdesign 9
Überlegungen zum Arbeitsablauf 10
Amplifikationsprotokoll 12
Thermalcycler Programm für Amplifikationsprotokoll 14
Qualitätskontrolle der PCR Produkte 14
SURVEYOR Nuclease-Verdau 14
Kontrollverfahren 16
Qualitätskontrolle des SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit *Exon 2 CE* IVD 16
Verwendung der *KRAS*-Kontrollplasmid-DNAs 16
Interpretation der Ergebnisse 17
Analyse des *KRAS* Exon 2 mit der SURVEYOR Nuclease 17
Beispielergebnisse 18
SURVEYOR Scan Aufrufverfahren 19
Manuelle Prüfung von WAVE *MCE* Gelbildern und Elektropherogrammen 29
Manuelle Prüfung des MCE-Score = 1 Resultat 30
Fehlercode W-01 Manuelle Prüfung 32
Leistungsmerkmale 33
Nachweisgrenze des SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* 33
KRAS Exon 2 G12S Mutationsniveau von Ermittlungs-Verdünnungsserien 33
KRAS Exon 2 G13D Mutationsniveau von Erfassungs-Verdünnungsserien 35
Sequenzbestätigung 35
Verfahrensbeschränkungen 36
Literaturnachweis 37
Anhang 38
Fehlersuche 38
Einzelheiten zur Bestellung 45
Kontaktdaten 46
Lizenzen, Handelsmarken & Copyright 46

Anmerkung: In diesem Dokument kann auf alle Kapitel und Abschnittstitel im Inhaltsverzeichnis, auf die im Fließtext entsprechend Bezug genommen wird, leicht zugegriffen werden, indem man die STRG-Taste gedrückt hält und mit der linken Maustaste auf den Titel drückt.

Hersteller

Hersteller		Transgenomic, Inc. 12325 Emmet Street, Omaha, NE 68164, USA. Tel 1-402-452-5400.
Vertreter in der EU		Transgenomic Limited, 40 Watt Road, Hillington Park, Glasgow G52 4RY, GB. Tel +44-141-892-8800.

SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* mit dem WAVE MCE System

Verwendungszweck

Anwendung nur durch Fachpersonal. Das SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit von Transgenomic mit dem WAVE *MCE* System *ist ein In-vitro-Diagnostikum*, das somatische Mutationen in Exon 2 des KRAS Gens nachweist. Diese Mutationen werden durch SURVEYOR Nuclease Zellteilungs-Spitzenwerte angezeigt und enthalten jene Mutationen mit bekanntem Potenzial für klinische Bedeutung. Dieses Kit ist für den Gebrauch in einem Labor für klinische Diagnostik durch entsprechend ausgebildetes Fachpersonal vorgesehen. Getestet wird DNA, die aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe extrahiert wird.

Dieses Kit, Katalognummer 710105-CEIVD, wird in einem Karton geliefert, der die nachstehend aufgeführten Komponenten enthält. Diese Bedienungsanleitung ist auch als Download unter http://www.Transgenomic.com/pd/surveyor/SURVEYORKRAS_MCE_CEIVD.asp erhältlich.

Angaben zum Gebrauch

Mediziner können den SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* mit dem WAVE *MCE* System als Hilfe bei der Entscheidung verwenden, ob Patienten mit kolorektalem Karzinom auf eine Therapie mit Anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor bzw. epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor)-Therapeutika wie Vectibix® oder Erbitux® ansprechen.

Das SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* mit dem WAVE *MCE* System **darf nicht** zur Diagnose von kolorektalen oder anderen Krebsarten verwendet werden.

Der *SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit Exon 2 CE IVD* mit dem WAVE *MCE* System weist auf die Anwesenheit von Mutationen im K-RAS-Gen Exon 2 hin, bestätigt aber nicht die Sequenzidentität der Mutation. Um nachzuweisen, um welche Mutation es sich genau handelt, sind weitere Untersuchungen wie zum Beispiel eine DNA-Sequenzierung erforderlich.

Die mit diesem Kit erhaltenen Ergebnisse sollten für den Arzt ein Hinweis auf den Mutationsstatus eines Patienten sein. Es müssen weitere klinische Faktoren berücksichtigt werden; die Ergebnisse des SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* mit dem WAVE *MCE* System **dürfen nicht als einzige Methode zur Entscheidungsfindung einer Behandlung von Patienten mit kolorektalem Karzinom herangezogen werden**. Genauer gesagt sollte der Gebrauch der *WAVE MCE* Software, um mit diesem Kit Proben mit positivem Testergebnis für eine *KRAS*-Mutation zu identifizieren, nur als Richtlinie verwendet werden, und alle Mutationen müssen durch eine weitere Analyse wie zum Beispiel durch eine DNA-Sequenzierung bestätigt werden.

Testprinzip des SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Assay

KRAS

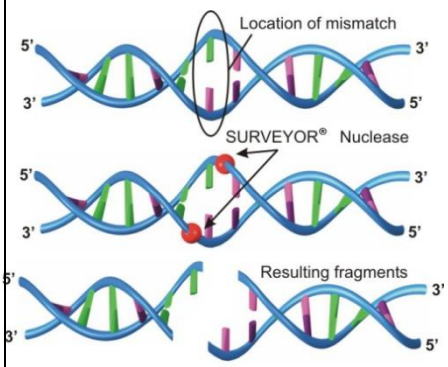
Neu entwickelte, auf den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gerichtete therapeutische Wirkstoffe wie Cetuximab (Erbitux®) und Panitumumab (Vectibix®) haben sich bei kolorektalem Karzinom als wirksam erwiesen. Forscher berichten, dass rund *40%* der kolorektalen Tumore somatische KRAS Genmutationen tragen, und diese Mutationen wurden mit dem schlechten Ansprechen auf EGFR-Antagonisten in Verbindung gebracht. Der *K-RAS* Mutationsstatus kann daher eingesetzt werden, um zu bestimmen, ob ein Tumor auf die Anti-EGFR-Therapie ansprechen wird. Dieses Kit wurde für den Gebrauch in der diagnostischen Analyse von somatischen *KRAS* Exon 2 Mutationen, die eine Auswirkung auf die Drogeneffizienz haben, entworfen.

Das *SURVEYOR* Scan *KRAS* Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* für das WAVE *MCE* MicroChip Electrophoresis System ist ein **diagnostisches Testkit für** den Nachweis aller Sequenzen und kleiner Insertions-/Deletionsmutationen in Exon 2 des KRAS Gens. Positivkontrollen für Exon-2-Mutationen in Codon 12 und 13, die mit der mangelnden Wirksamkeit der Anti-EGFR-Wirkstoffe in Verbindung gebracht wurden, werden mitgeliefert.

Dieses Kit verwendet die patentrechtlich geschützten Technologien SURVEYOR Nuclease und das WAVE *MCE* System von Transgenomic, die einen einfachen und empfindlichen Mutationsnachweis bieten. Damit kann ein Gemisch aus 2-5 % mutanter vor einem Hintergrund von nicht-mutanter DNA nachweisen können. Validierungsuntersuchungen haben eine extrem hohe Übereinstimmung mit der Sequenzierung von gut untersuchten kolorektalen Tumorproben gezeigt. Durch die Verwendung des SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* reduziert sich für den Anwender die Sequenzierungsarbeit und ermöglicht darüber hinaus aggressive Sequenzzuordnung, wo eine automatische Sequenzierungssoftware eine Mutation oft nicht klären kann.

SURVEYOR Nuclease

Die SURVEYOR Nuclease von Transgenomic ist eine mismatch-spezifische Pflanzen-DNA, die Heteroduplex-DNA auf bekannte und unbekannte Mutationen und Polymorphismen durchsuchen kann. Das Enzym schneidet mit hoher Spezifizität einen DNA-Doppelstrang an Stellen, wo durch einen Basenaustausch oder andere Sequenzveränderungen Basen nicht miteinander paaren können. Diese DNA-Nuclease spaltet beide Stränge eines DNA-Heteroduplex am 3'-Ende der Mismatch-Stelle. Insertions-/Deletion-Mismatches und alle Basenaustausch-Mischmatches werden erkannt, aber die Spaltungseffizienz variiert mit der Mismatch-Sequenz.



Mismatch-Stelle.

SURVEYOR Nuclease

Resultierenden Fragmente

Wirkungsweise der SURVEYOR Nuclease. Die Endonuclease erkennt ein Mismatch und spaltet am 3'-Ende der Mismatch-Basen. Damit wird der DNA-Doppelstrang gespalten, was einen einzigen 3'-Basenüberhang hinterlässt.

Abbildung A

Die SURVEYOR Nuclease wurde in einer ganzen Reihe von Projekten eingesetzt, um in Genen eine Vielzahl von Mutationen und Polymorphismen nachzuweisen. Insbesondere wird die SURVEYOR Nuclease verwendet, um bekannte Mutationen in einer Reihe von Genen zu bestätigen, die mit Nieren-, Lungen-, Kopf- und Halskrebs sowie Leukämie und Endometriumkarzinom in Verbindung gebracht werden. Ebenso wurde das Enzym zur Ergebnisprognose einer Strahlentherapie eingesetzt.

Das *SURVEYOR Scan KRAS* Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* für WAVE *MCE* Systeme ist zur Spaltung von Mismatches im *KRAS* Exon 2 und der anschließenden Analyse durch die Microchip-Kapillarelektrophorese vorgesehen.

Anmerkung: Für diesen Test ausschließlich die mit diesem Kit mitgelieferte DNA-Polymerase verwenden.

Anmerkung: Befolgen Sie bitte die spezifischen Anleitungen im *WAVE MCE System* Schnellhandbuch und das *WAVE MCE System* Bedienungshandbuch.

Um dieses Kit erfolgreich einzusetzen, wird dringend angeraten, diese Bedienungsanleitung sorgfältig durchzulesen und alle darin gegebenen Anleitungen und Richtlinien genau zu befolgen. Personen, die diesen Test zum ersten Mal durchführen, sollten die in Abschnitt „*Verwendung der KRAS Kontrollplasmid-DNAs*" beschriebenen Kontrolluntersuchungen durchführen.

Falls Sie weitere Fragen haben oder Hilfe benötigen, rufen Sie **(888) 233-9283** (nur Nordamerika), +1 **(402) 452-5400** oder *+44 (0) 141 892 8800* (Europa) an und fragen Sie nach dem „KRAS Support". ***Alternativ können Sie eine E-Mail senden an:***

SURVEYORscan@Transgenomic.com

Rückverfolgbarkeit der Kit-Kontrollen

Die mit diesem Kit mitgelieferten Kontrollen sind Plasmidklone der *KRAS*-Exon-2-Sequenzen. Alle Klone wurden sequenziert, um sie im Vergleich zur NCBI-Referenzsequenz auf Sequenztreue zu überprüfen: NG_007524.1.

Die „**KRAS Control**: **Wild-Type Exon 2**" wurde durch *PCR* des KRAS Exon 2 aus einer genomischen Wildtyp-DNA-Präparation und Klonierung konstruiert.

Die „**KRAS Positive Control Codon 12**" wurde durch ortsspezifische Mutagenese der KRAS-*Kontrolle* konstruiert: Wild-Type Exon 2-Klon. Durch DNA-Sequenzierung wurde bestätigt, dass die einzige Änderung in der Sequenz von Codon 12 in einer GGT>AGT-Alteration vorliegt. Dies wird dann im Verhältnis 50:50 mit der KRAS Control: Wild-Type Exon 2-DNA gemischt, um eine heterozygote Mischung zu erhalten.

Die „**KRAS Positive Control Codon 13**" wurde durch ortsspezifische Mutagenese der KRAS-*Kontrolle* konstruiert: Wild-Type Exon 2-Klon. Durch DNA Sequenzierung wurde bestätigt, dass die einzige Änderung in der Sequenz von Codon 13 in einer GGC>GAC-Alteration vorliegt. Dies wird dann im Verhältnis 50:50 mit der *KRAS* Control: Wild-Type Exon 2-DNA gemischt, um eine heterozygote Mischung zu erhalten.

Nähere Angaben zu den DNA-Sequenzen der Kontrollen siehe **Verwendung der *KRAS* Kontrollplasmid-DNAs**.

Kit-Komponenten

Das SURVEYOR Scan *KRAS* Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* mit dem WAVE *MCE* System besteht aus einem Karton mit 18 Reagenzgefäßen. In jedem Karton bleiben 7 Löcher leer.

Katalognummer	Kit-Komponente	Farbe Röhrchen-deckel	Kit für 100 Testreaktionen gelieferte Menge
703310	DNA Polymerase (2.5 U/µL)	Rot	100 µL
703315	DNA Polymerase 10X PCR Buffer	Weiß	1000 µL
703065	dNTPs (10 mM)	Durchsichtig	500 µL
710155F	*KRAS* Primer: Exon 2 Forward (10 µM)	Blau	2 x 125 µL
710155R	*KRAS* Primer: Exon 2 Reverse (10 µM)	Blau	2 x 125 µL
710153F	Universal Seq Primer 1 (10 µM)	Orange	125 µL
710153R	Universal Seq Primer 2 (10 µM)	Orange	125 µL
710160	SURVEYOR Nuclease W	Violett	2 x 105 µL
710161	SURVEYOR Enhancer W2	Schwarz	105 µL
708049	SURVEYOR Enhancer Cofactor	Rosa	105 µL
708027	0,15 M MgCl2 Solution	Braun	105 µL
708030	Stop Solution	Rot	250 µL
710141	*KRAS* Control: Wild-Type Exon 2	Gelb	40 µL
710143	*KRAS* Ex 2 Positive Control Codon 12	Grün	40 µL
710144	*KRAS* Ex 2 Positive Control Codon 13	Grün	40 µL
482356	Bedienungsanleitung	Download von der Webseite*	

http://www.Transgenomic.com/pd/surveyor/SURVEYOR*KRAS*_MCE_CEIVD.asp

Anzahl der Proben, die mit dem Kit getestet werden können

Mit dem SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* mit dem WAVE *MCE* System können 100 Reaktionen getestet werden. Die Gesamtprobenanzahl hängt von der Größe der jeweiligen durchschnittlichen Seriengrößen zu testender Proben ab, da mit jeder Probenserie jeweils ein Satz Kontrollen getestet werden muss.

In der nachstehenden Tabelle ist die Anzahl Proben aufgeführt, die mit dem *KRAS* Kit je nach durchschnittlicher Seriengröße getestet werden können. Die Berechnung beruht auf der Basis, dass (a) jede Serie 4 Kontrollen benötigt, und (b) jedes Kit für 100 Reaktionen ausgelegt ist.

Mit Ansteigen der Seriengröße erhöht sich auch die Anzahl der Proben, die insgesamt getestet werden können, was die durchschnittlichen Reagenzienkosten je Probe reduziert.

Seriengröße	Anzahl der Kontrollen + Probenamplikons	Tests/Lauf	Gesamttestläufe/Kit	Getestete Proben/Kit
1	4 + 1	5	20	20
2	4 + 2	6	16	32
3	4 + 3	7	14	42
4	4 + 4	8	12	48
5	4 + 5	9	11	55
6	4 + 6	10	10	60
11	4 + 11	15	6	66
21	4 + 21	25	4	84
29	4 + 29	33	3	87
46	4 + 46	50	2	92
96	4 + 96	100	1	96

DNA-Sequenzierung

Sequenzierungsprimer (PN 710153F und 710153R) werden auf Wunsch für die DNA-Sequenzierung aller getesteten Proben geliefert. Die vor der SURVEYOR Nuclease digestion geschaffenen PCR Amplikons sollten für die Sequenzierung verwendet werden.

Zusätzlich erforderliche Ausrüstung und Reagenzien

Folgende Komponenten bzw. Ausrüstungen sind für die Verwendung des SURVEYOR Scan *KRAS* Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* mit dem WAVE *MCE* System zusätzlich erforderlich:

WAVE *MCE* System (PN MCE-99-2020B)
WAVE *MCE* Optimized Microchip, (PN MCE-99-3600)
WAVE *MCE* Optimized Separation Buffer Kit (PN MCE-99-5000)
WAVE *MCE* Optimized Marker Kit (PN MCE-99-5500)
Hochreines Wasser für die Molekularbiologie
0,2 mL-PCR Röhrchen, Streifen oder 96-Lochtiterplatte
Mikropipetten
Pipettenspitzen
Eisbad
Vortexer
Mikrozentrifuge
Thermal cycler
Agarosegele und Ausrüstung für Agarosegel-Elektrophorese.
10 % Bleich- oder ähnliches Reinigungsmittel

Reagenzienvorbereitung

Alle Reagenzien dieses Kits sind gebrauchsfertig. Einige Komponenten müssen vor Gebrauch aufgetaut, mit dem Vortexer gemischt oder in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert werden. Einzelheiten siehe weiter unten unter **Testverfahren**. Reagenzien müssen zur Herstellung von Master-Mix und Reaktionsgemischen gemischt werden. Eine genaue Anleitung finden Sie im Abschnitt **Testverfahren**.

Lagerung und Haltbarkeit

Das Kit muss bis zu seinem Gebrauch zwischen -18 ºC und -25 °C in einem Gefrierschrank mit konstanter Temperatur aufbewahrt werden. Beachten Sie bei jedem erhaltenen Kit das Verfalldatum. Das Kit nicht mehr verwenden, wenn das Verfallsdatum überschritten ist.

Das in Schritt 7 des SURVEYOR Nuclease **Verdaus** vorbereitete SURVEYOR Nuclease Gemisch muss **sofort** verwendet werden, da die Anwesenheit anderer Komponenten im SURVEYOR Nuclease-Reaktionsgemisch die SURVEYOR Nuclease W mit der Zeit inaktiviert.

Warnhinweise & Vorsichtsmaßnahmen

Keines der Reagenzien in diesem Kit stellt in den gelieferten Mengen eine Gesundheitsgefährdung dar. Die Dokumentnummer von Transgenomic MSD-710105 steht als Download zur Verfügung:

http://www.transgenomic.com/lib/msds/WAVEMCEMSD.asp

Dieses Kit enthält keine Substanzen tierischen oder menschlichen Ursprungs, die ein Infektionsrisiko darstellen können.

Dieses Kit darf nur von Personen verwendet werden, die in den entsprechenden Labortechniken ausgebildet wurden. Beim Arbeiten mit den Kitkomponenten immer einen passenden Laborkittel, Einmalhandschuhe und Augenschutz tragen. Nach dem Gebrauch müssen die Kitkomponenten als klinischer Abfall und gemäß der für sie anwendbaren Gesetze und Verordnungen entsorgt werden.

Aus den Gefäßen pipettierte Reagenzienaliquots dieses Kits sind nur zum einmaligen Gebrauch bestimmt. Es konnte validiert werden, dass Kitkomponenten auch nach 25 Auftau-/Einfrierzyklen noch stabil sind. Verwenden Sie das Kit nicht, wenn diese Anzahl Zyklen überschritten wurde.

Primäre Probenentnahme, Handhabung und Lagerung

Das SURVEYOR Scan *KRAS* Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* mit dem WAVE *MCE* System benötigt DNA, die aus formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) kolorektalen Tumorproben extrahiert wurde. Für eine optimale DNA-Extraktion muss das Gewebe 14-24 Stunden in Formalin fixiert werden.

Tumorbiopsien sind eine heterogene Mischung von Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen. Außerdem ist der Tumor an sich eine heterogene Mischung von Tumorzellen **mit** Mutationen und Tumorzellen **ohne** Mutationen. Da diese somatischen Mutationen nicht gleichmäßig auf den Tumor verteilt werden können, kann die aus verschiedenen Bereichen desselben Tumors resultierende Mutationsanalyse unterschiedlich sein. Um die Wahrscheinlichkeit, eine Mutation zu ermitteln, zu steigern, sollte die DNA aus der Tumorregion des Gewebes isoliert werden, indem nur der Tumorbereich von dem Glasobjektträger abgeschabt und dazu ein frisches, steriles Skalpell für jeden neuen Objektträger verwendet wird.

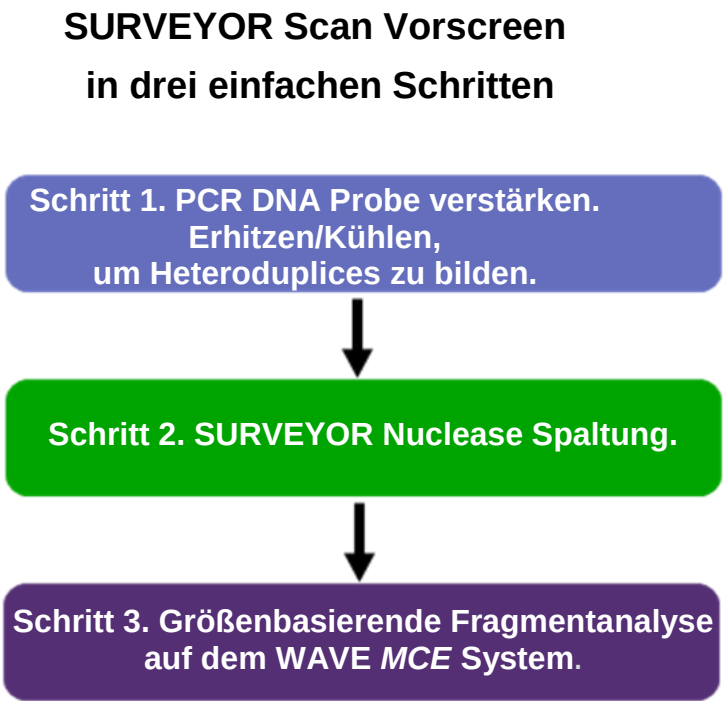
Für eine erfolgreiche Verwendung dieses Kits sollte die entnommene DNA den Kriterien entsprechen, die in den **Überlegungen zur Vorlage** aufgelistet sind.

ANMERKUNG: Entnommene DNA Proben, die mit diesem Kit nicht sofort analysiert werden, müssen bei -20 ºC bis -80 ºC gefroren aufbewahrt werden.

Testverfahren

Somatischer Mutationsnachweis mit SURVEYOR Scan Kits – Ein Überblick

Nachweis und Bestätigung einer Mutation mit der SURVEYOR Nuclease umfasst drei Schritte:


SURVEYOR Scan Vorscreen
in drei einfachen Schritten
Schritt 1. PCR DNA Probe verstärken.
Erhitzen/Kühlen,
um Heteroduplices zu bilden.
Schritt 2. SURVEYOR Nuclease Spaltung.
Schritt 3. Größenbasierende Fragmentanalyse
auf dem WAVE MCE System.

Schritt 1 - Vorbereiten der PCR-Amplikons aus mutanter (Test) und normaler (Referenz) DNA. Anschließend an den letzten PCR-Amplifikationszyklus wird zum Schmelzen sämtlicher Doppelstränge das PCR-Produkt erhitzt und dann zur optimalen Bildung von Hetero- und Homoduplices langsam abgekühlt (Heteroduplices kommen vor, wenn ein Strang einer Wildtyp-Sequenz mit einem Strang einer mutanten Sequenz abkühlt).

Schritt 2 – Behandlung des hybridisierten Heteroduplex-Homoduplex-Gemischs mit SURVEYOR Nuclease. SURVEYOR Nuclease schneidet die Hetereroduplex-DNA und lässt DNA-Fragmente entstehen. Die gleichbehandelte Wild-Type-Referenz-DNA dient als Hintergrundkontrolle.

Schritt 3 – Analyse der DNA-Fragmente mit dem WAVE *MCE* System. Die Bildung neuer Spaltprodukte aufgrund von einem (bzw. mehreren) Mismatch wird durch die Anwesenheit weiterer Elektropherogramm-Peaks angezeigt. Die Retentionszeit der Spaltprodukte weist auf die Größe der Fragmente und daher den Ort des/der Mismatches hin.

Schritt-für-Schritt-Anleitung

Setup/Kalibrierung des WAVE *MCE* Systems

Wenn Sie den SURVEYOR Nuclease Objektträger auf dem WAVE *MCE* System einstellen, nehmen Sie bitte auf das WAVE *MCE* System-*Bedienungshandbuch* Bezug.

ANMERKUNG: Das Objektträger-Setup mit den Bedienelementen ist für den Gebrauch der Software für die Analyse erforderlich.

Überlegungen vor Beginn der *KRAS* Probenanalyse

Bevor Sie Proben auf dem WAVE *MCE* System laufen lassen, muss der WAVE *MCE* Optimized DNA Size Standard laufen. Es muss jeder im System geladene Mikrochip verwendet werden, um zu garantieren, dass das WAVE *MCE* System einwandfrei läuft. Das Laborpersonal, das das Instrument verwendet, sollte die Qualität des WAVE MCE Optimized DNA Size Standard prüfen (siehe **WAVE *MCE* System-Bedienungshandbuch**).

Überlegungen zu den Matrizen

1. Verwenden Sie für die FFPE isolierte Matrizen-DNA die üblichen Labortechniken, um die Qualität und Quantität der extrahierten DNA zu bewerten und um zu gewährleisten, dass für die PCR eine amplifizierbare Matrize vorhanden ist.
2. Das 260/280 Absorptionsverhältnis muss größer als 1,80 sein
3. Um das PCR Setup zu beschleunigen, regeln Sie die Gebrauchskonzentration der Matrize auf ungefähr 12,5 ng/µL. Verdünnen Sie ggf. die Matrizen-DANN mit hochreinem Wasser für die Molekularbiologie.

Primerdesign

1. Die Sequenzen der in diesem Kit gelieferten Primer sind wie folgt:

Amplikon		Sequenz
KRAS Primer: Exon 2	*Forward*	aggaaacagctatgaccatTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAA
	Reverse	tgtaaaacgacggccagtTGCATATTAAAACAAGATTTACCTCTATTG
Universal Seq Primer 1		aggaaacagctatgaccat
Universal Seq Primer *2*		tgtaaaacgacggccagt

ANMERKUNG: Die *KRAS* Exon 2 Primer haben Universal Sequenzierungsschwänze, wie in Kleinschrift angegeben.

2. Die Amplikonsequenz ist wie folgt:

   a. Die bindende Stelle des Forward-Primer ist in **Grün** hervorgehoben. Das Reverse-Complement der bindenden Stelle des Reverse Primer ist **rot** markiert. Kodierende Regionen sind groß geschrieben und unterstrichen. Die häufigsten Mutationsregionen sind **violett** markiert. Großbuchstaben, die nicht unterstrichen sind, sind nichtkodierende exonische DNA-Bereiche.

***KRAS* Control: Wild-Type Exon 2**

NCBI Reference Sequence: NG_007524 Exon 2 loci: 10.428–10,706

Amplikongröße: 190 bp (mit Schwänzen), 153 bp (ohne Schwänze)

cgggtttgtattaaaaggtactggtggagtatttgatagtgtattaaccttatgtgtgacatgttctaa
tatagtcacattttcattatttttattataagGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGT
TGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATA
TGATCCAACAATAGAGgtaaatcttgttttaatatgcatattactggtgcaggaccattctttgataca
gataaacccg

Überlegungen zum Arbeitsablauf

Das Kit ist für die Analyse von 100 Reaktionen ausgelegt. Kleinere Probenserien können ausgeführt werden, aber die Kit-Kontrolle und eine "keine-Matrize-Kontrolle müssen bei jeder Probenserie enthalten sein. Im Kit ist ausreichend Kontrollmaterial für 100 Reaktionen aller Kombinationen der zu verwendenden Probenseriengrößen.

Im Allgemeinen sollte die Probenverarbeitung von Anfang bis Ende so ausgeführt werden, wie in dieser Bedienungsanleitung beschrieben. Wenn die Verarbeitung einer Probe vor der Fertigstellung aller Schritte gestoppt werden muss, sollte die DNA an den angegebenen Orten bei -20 °C gelagert werden. Dennoch sollten die gefrorenen Proben nicht wiederholten Einfrier-/Auftauzyklen ausgesetzt werden, und die Tiefkühllagerung (-18 bis -25 °C) von PCR-amplifizierter DNA bzw. SURVEYOR Nuclease Verdauungsprodukten über längere Zeiträume (>1 Woche) sollte vermieden werden.

Die Probenanalyse sollte dem unten aufgeführten Arbeitsablauf folgen:

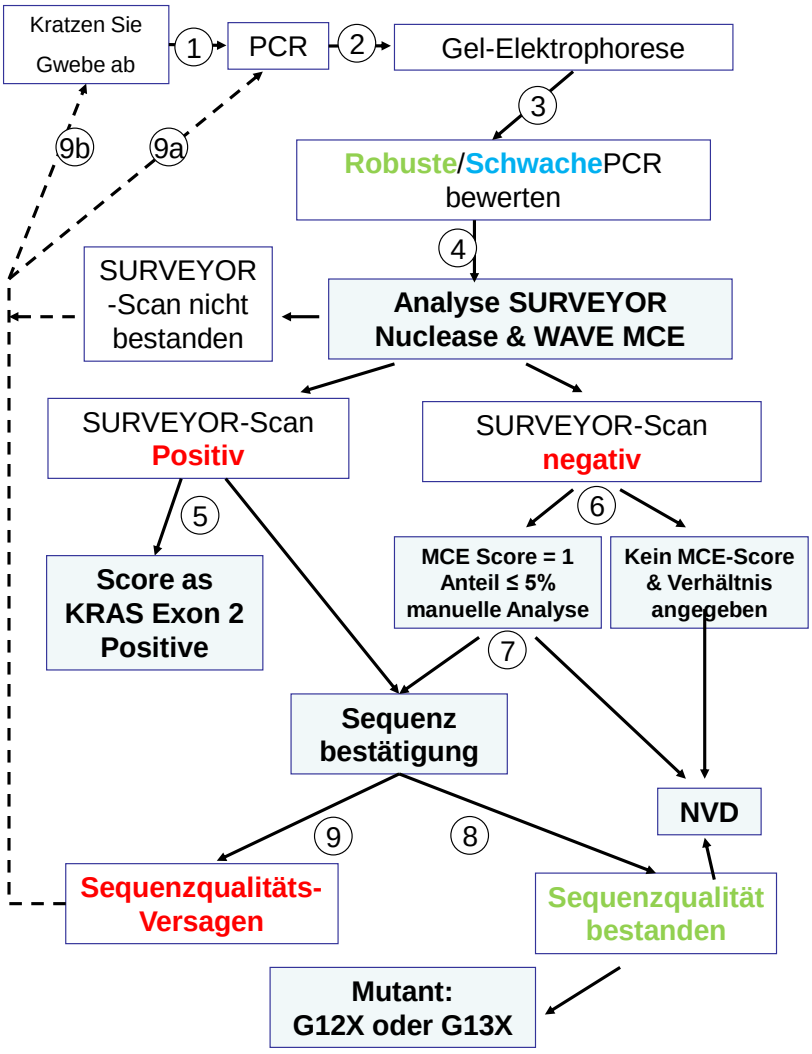


Abbildung 1: Arbeitsablauf der SURVEYOR Scan *KRAS* Kit Analyse

Anmerkungen zu Abbildung 1

1. Isolieren Sie die DNA von FFPE und verwenden Sie dazu Standardlabortechniken.
2. Führen Sie die PCR durch und prüfen Sie die DNA-Qualität durch Gel-Elektrophorese.
3. Zeichnen Sie auf, ob das PCR-Band **robust** (≥20 ng/µL) oder **schwach** (<20 ng/µL) ist.

Bereiten Sie frische genomische DNA aus FFPE vor, wenn es Mehrfach-PCR-Bänder gibt.

4. Gehen Sie mit Proben, die nach der PCR Amplifizierung als **robuste PCR** oder **schwache PCR** bewertet wurden, zur SURVEYOR Nuclease-Behandlung und WAVE *MCE* System-Analyse über.

   Beachten Sie, dass mit einem schwachen PCR-Aufruf unzureichende DNA für die Erzeugung aussagefähiger Ergebnisse auf der WAVE *MCE*-Plattform, aber genug DNA für die Sequenzierung vorhanden sein kann.

5. Alle Proben mit einem positiven SURVEYOR Scan-Resultat sollten entweder:
   a. als *KRAS* Exon 2 positiv gekennzeichnet werden; bzw.
   b. für die DNA-Sequenzbestätigung eingesendet werden, falls die präzise Identität einer Mutation erforderlich ist.
6. Es gibt zwei Kategorien von Proben mit einem negativen SURVEYOR Scan-Resultat:
   a. Proben mit keiner MCE-Bewertung werden und einem angegebenen Verhältnis werden als „NVD“ (No Variant Detected = keine Variante nachgewiesen) bewertet.
   b. Proben mit einer MCE-Bewertung = 1 und einem Spitzenverhältnis von ≤ 5 % sind Grenzfälle. Diese Resultate sollten manuell analysiert werden. Für Beispiele sehen Sie in der **Manuellen Prüfung des MCE-Scores = 1 Resultat** nach.
7. Nach der manuellen Analyse von Proben mit einer MCE-Score =1, Ratio ≤ 5 %, sollten alle Proben, bei denen etwaige SURVEYOR Nuclease-Spaltprodukte festgestellt werden, für die Sequenzbestätigung eingesendet werden. Proben mit keinen sichtbaren Bereichen sollten als „NVD“ (No Variant Detected = keine Variante nachgewiesen) bewertet werden.
8. Bei einer akzeptablen Bestätigungsanalyse sollten eines der folgenden Resultate zutreffen:
   a. „Wildtyp“-Sequenz, d. h. „No Variant Detected“ (keine Variante nachgewiesen - NVD); oder
   b. Variante nachgewiesen (Variant detected). Wenn die Sequenzbestätigung eine Basisänderung in Position *1* oder 2 von Codon 12 bzw. 13 anzeigt, kann eine Mutation (Änderung in Aminosäure), d. h. KRAS Aktivierung, bewertet werden.
   c. Wenn die Sequenzbestätigung eine Änderung in Basis-Position 3 von Codon 12 bzw. 13 anzeigt, ist eine stille Mutation vorhanden. Laut Definition ändert eine stille Mutation die Aminosäure des *KRAS* Proteins nicht und wirkt daher als „Wild-Type“ Protein.
9. Wenn bei der Sequenzbestätigung kein berichtenswertes Ergebnis gefunden werden kann:
   a. Wiederholen Sie die PCR, wenn noch ausreichend genomische DNA vorhanden ist
   b. Extrahieren Sie erneut DNA aus FFPE; dies muss die zweite Wahl sein, da es normalerweise nicht wünschenswert ist, einen FFPE –Block nachzuschneiden.

Anmerkung: Es ist möglich, einen **positiven** SURVEYOR Scan-Abruf zu haben, aus dem auch „No Variant Detected“ (keine Variante festgestellt) aus der Sequenzbestätigungsprüfung hervorgeht. Das Erfassungsniveau (LOD) der SURVEYOR Nuclease auf WAVE *MCE* ist so niedrig wie 2% Mutant in 98% Wildtyp-DNA für einige Mutationen, wohingegen das Sequenzierungs-LOD circa 10-25 % Mutant in 90-75 % Wildtyp-DNA beträgt.

Anmerkung: Positive SURVEYOR-Scan-Resultate können sich aufgrund von Base-Veränderungen von denen unterscheiden, die *KRAS* aktivieren, z. B. (a) stille Mutationen von Kodon 12 [GGT (Wildtyp) zu GGC, GGA bzw. GGG] oder Kodon 13 [GGC (Wildtyp) zu GGA, GGT bzw. GGG] oder (b) eine Mutation in einem anderen Kodon als 12 oder 13. Obwohl diese Mutationen selten sind, ist eine Bestätigung durch eine andere Methode, wie z. B. DNA-Sequenzierung erforderlich, falls der Verwender des Kits die Sequenzidentität von Exon-2-Mutationen benötigt, bevor ein **positives** SURVEYOR-Scan-Resultat al seine *KRAS*-aktivierende Mutation aufgezeichnet werden kann.

Anmerkung: der Formalinfixierungsprozess, der für die Vorbereitung von FFPE Tumorbiopsieproben verwendet wird, kann Cytosin-Desaminierung zur Folge haben. Diese Desaminierung wandelt Cytosin in Uracil um. Die Polymerase „liest“ dieses Uracil als ein Thymin und bindet ein Adenin in die

duplizierten Stränge ein. Dies scheint dann eine Mutation zu sein, wo das normale G jetzt durch ein A ersetzt wird und eine GC- zu AT-Mutation verursacht, die eine Artefaktmutation durch den Fixierungsprozess und keine echte somatische Mutation ist. Diese Vorfälle sind selten, wenn sie jedoch für im PCR-Cycling dupliziert werden, sehen Sie wie Mutationen aus. Sie reagieren nicht auf eine erneute Analyse.

KRAS-Mutationen, die aus Cytosin-Desaminierung entstehen können, beinhalten:

- Codon 12: AGT (G12S) und GAT (G12D)
- Codon 13: AGC (G13S), GAC (G13D) und GGT (G13G, eine stille Mutation)

Daher wird empfohlen, dass all diese Mutationen durch die Duplikatanalyse für dieselbe genomische DNA bestätigt oder dass alle Proben ab Analysebeginn der Duplikatanalyse unterzogen werden.

Amplifikationsprotokoll

1. Die vorgemischte dNTP Lösung (PN 703065) von Transgenomic wird in einer Gebrauchskonzentration von 10 mM Gesamtdeoxynucleotid (je 2,5 mM der vier Deoxynucleotide) geliefert.
2. Die Exon 2 Forward- und Reverse- PCR-Primer (PN 710155F und 710155R) werden bei 10 µM geliefert.
3. Nehmen Sie die 10 µM Primer, 10 mM vorgemischte dNTP Lösung und den DNA Polymerase 10X PCR Buffer (PN 703315) aus dem Gefrierschrank und lassen Sie alles auf Eis auftauen.
4. Nach dem Auftauen: geben Sie alle Kit-Komponenten in den Vortexierer (~10 Sekunden), um sorgfältig zu mischen, zentrifugieren Sie kurz (~10 Sekunden), um zu gewährleisten, dass keine Flüssigkeit auf den Behälterdeckeln bleibt, und legen Sie sie auf Eis.
5. Bereiten Sie auf Eis den Master-Mix vor.
6. Bereiten Sie den Master-Mix für *KRAS* Exon 2 anhand der folgenden Tabelle vor:

Anzahl der Reaktionen:	**1.00**
Volumenberechnung:	
Volumen Wasser (µL)	**33.0****
DNA Polymerase 10X PCR Buffer (µL)	**5.0**
dNTPs (µL)	**4.0**
***KRAS* Primer: Exon 2 Forward (µL)**	**2.5**
***KRAS* Primer: Exon 2 Reverse (µL)**	**2.5**
DNA Polymerase (µL)	**1.0**
Mastermix-Gesamtvolumen:	**48.0**
Volumen hinzuzufügender extrahierter DNA (**µL** bei **12,5 ng/µL**)	2.0**
Gesamtvolumen PCR-Reaktion:	**50.0**

***Hinweis: Der Anwender sollte darauf zielen, ein Minimum von 25 ng DNA je 50 µL Reaktion zu haben. Erhöhen Sie** für extrahierte DNA-Konzentrationen mit weniger als 12.5 ng/**µL** proportional **das Volumen extrahierter DNA, um je Reaktion 25 µL zu erhalten**. **Reduzieren Sie auch das Volumen an Wasser in dem Master-Mix um dieselbe Menge, um je Reaktion 50 µL zu erhalten. Alle mit diesem Master-Mix vorbereiteten Proben brauchen extrahierte DNA, die auf annähernd dasselbe niedrigste Konzentrationsniveau verdünnt ist. Es ist nicht empfehlenswert, Konzentrationen extrahierter DNA mit weniger als 5 ng/µL einzusetzen.**

7. Berechnen Sie das erforderliche Volumen für den Master-Mix, indem Sie die in der Tabelle oben angegebenen Volumen mit der Gesamtzahl zu testender Proben plus 4 zusätzlichen Reaktionen für die Kontrollen multiplizieren.
   Berücksichtigen Sie, dass ein leicht größerer Mastermix als in dieser Berechnung benötigt wird, um Verluste während des Pipettierens anzurechnen.

8. Beschriften Sie 0,2 mL-PCR Reaktionsgefäße oder die Näpfchen einer 96-Näpfchen-Platte mit den erforderlichen Probeninformationen.
9. Beschriften Sie ein 2,0 mL-Zentrifugenröhrchen für den vorbereiteten Master-Mix.
10. Fügen Sie diesem 2,0 mL-Zentrifugenröhrchen mit der Beschriftung „Master Mix“ das erforderliche Volumen hochreinen Wassers für die Molekularbiologie hinzu.
11. Fügen Sie dem Master-Mix-Röhrchen die erforderliche Menge DNA Polymerase 10X PCR Buffer hinzu.
12. Fügen Sie dem Master-Mix-Röhrchen das erforderliche Volumen der 10,0 mM vorgemischten dNTPs-Gebrauchslösung hinzu.
13. Fügen Sie dem Master-Mix-Röhrchen das erforderliche Volumen ***KRAS* Primer: Exon 2 Forward** hinzu.
14. Fügen Sie dem Master-Mix-Röhrchen das erforderliche Volumen ***KRAS* Primer: Exon 2 Reverse** hinzu.
15. Nehmen Sie die DNA Polymerase (PN 703310) aus dem Gefrierschrank.
16. Zentrifugieren Sie die DNA Polymerase für ~10 Sekunden.
17. Mischen Sie die DNA Polymerase für ~10 Sekunden mit dem Vortexer.
18. Fügen Sie dem Master-Mix-Zentrifugenröhrchen das erforderliche Volumen DNA Polymerase hinzu.
19. Schließen Sie das Master-Mix-Zentrifugenröhrchen mit dem Deckel.
20. Mischen Sie vor dem Gebrauch das Master-Mix-Zentrifugenröhrchen ~30 Sekunden mit dem Vortexer und zentrifugieren Sie es dann kurz ~10 Sekunden lang.
21. Lagern Sie es bis zum Gebrauch auf Eis
22. Pipettieren Sie 48,0 µL (siehe Anmerkung oben in Schritt 6) Master-Mix in die entsprechenden Wells. Wechseln Sie bei Verwendung einer Einkanalpipette jedes Mal die Spitze. Wenn Sie eine Dispenserpipette verwenden, achten Sie darauf, dass von Well zu Well nichts verspritzt wird. Halten Sie die Platte auf Eis.
23. Fügen Sie in den entsprechenden Näpfchen 2,0 µL (siehe Anmerkung oben in Schritt 6) der Probenmatrizen-DNAs oder Wasser (keine Matrizenkontrolle, NTC) hinzu. Verwenden Sie Pipettenspitzen für jede Probe und vermeiden Sie die Kreuzkontamination durch Verspritzen. Verschließen Sie die Wells mit den Proben-DNAs und dem NTC mit dem 8-Verschlussstreifen (bei Verwendung einer 96-Näpfchen-Platte) bzw. die 0,2 mL-PCR Reaktionsgefäße mit ihren Deckeln. Vergewissern Sie sich, dass die Deckel fest verschlossen sind.
24. Öffnen Sie erst dann die DNA-Kontroll-Matrize des Kits (PNs 710141, 710143, 710144). Pipettieren Sie diese Kontrollmatrizen als letzte, um das Risiko, Proben-DNA zu kontaminieren, zu senken. Verschließen Sie jedes Näpfchen wieder mit den 8-Verschluss-Streifen (wenn Sie eine 96-Näpfchen-Platte verwenden) schließen Sie die 0,2 mL-PCR Röhrchen mit dem Deckel. Vergewissern Sie sich, dass die Deckel fest verschlossen sind.

    ANMERKUNG: Wenn Sie die Matrize der WAVE *MCE* Platte verwenden, gehen die Kitkontrollen in die Näpfchen A1, B1 und C1. Setzen Sie die Nicht-Matrizenkontrolle (NTC) in Näpfchen H12.

25. Vortexen Sie (~1/2 Geschwindigkeit) 10 Sekunden lang.
26. Zentrifugieren Sie 1-2 Minuten lang, um zu garantieren, dass alle Lösungen auf dem Boden der Näpfchen oder Röhrchen gesammelt werden. Vergewissern Sie sich, dass alle Lösungen auf dem Boden jedes Näpfchens oder Röhrchens sind. Wenn dies nicht der Fall ist, wiederholen Sie die Zentrifugation.

Thermalcycler Programm für Amplifikationsprotokoll

1. Verwenden Sie folgendes Thermocycler Protokoll für die PCR Amplifikation und Heteroduplex-Bildung:

Initiale Denaturierung	95 °C	5 Minuten
15 Zyklen Touchdown	95 °C	30 Sekunden
	62 °C, -0,5 °C/Zyklus	30 Sekunden
	72 °C	25 Sekunden
30 Zyklen Amplifikation	95 °C	30 Sekunden
	55 °C	30 Sekunden
	72 °C	25 Sekunden
Finale Extension	72 °C	2 Minuten
Heteroduplex-Bildung	95 °C	2 Minuten
	Weniger oder gleich12 °C	Hold

Qualitätskontrolle der PCR Produkte

1. Bevor Sie mit dem SURVEYOR Nuclease Verdau fortfahren, müssen Qualität und Quantität des Amplikons durch Gel-Elektrophorese (oder äquivalente Mittel) geprüft werden.
2. Analysieren Sie ein Aliquot des PCR-Produkts zusammen mit mehreren verschiedenen Mengen einer 100-bp DNA-Basenpaarleiter.
3. Verwenden Sie die Basenpaarleiter, um die Konzentration amplifizierter DNA zu berechnen.
4. Es sollte nur eine einzige, dem Haupt-PCR-Produkt entsprechende Bande größer als 20 ng/µL verzeichnet werden.
5. Falls mehrere Bande vorhanden sind, vergewissern Sie sich, dass die Qualität der Eingangsmatrizen-DNA ausreichend war (siehe **Anhang – Fehlersuche**).
6. Falls kein Produkt zu sehen ist, vergewissern Sie sich, dass die Qualität der Eingangsmatrizen-DNA ausreichend war (siehe **Anhang – Fehlersuche**). Wenn die Qualität den Spezifikationen entspricht, erhöhen Sie das Volumen der Matrize auf 4,0 µL je 50 µL Reaktion (verringern Sie das Verhältnis Wasser-Reaktion auf 31,0 µL).
7. In der Kontrollprobe ohne Matrize dürfen keine PCR-Produkte zu sehen sein. Wenn DNA-Produkte nachweisbar sind, ist diese Kontrolle wahrscheinlich kontaminiert. ***Anhang - Fehlersuche***.
8. Bewerten Sie die PCR als „robuste“ PCR oder „schwache“ PCR.
    a. Eine „robuste“ PCR muss ein Einzelband haben, dass gleich oder größer als 20 ng/µL ist.
    b. Eine „schwache“ PCR muss ein Einzelband haben, dass kleiner als 20 ng/µL ist.
    c. Führen Sie den SURVEYOR Nuclease Verdau mit Robusten und Schwachen PCR Schnitten durch.

TIPP: In diesem Stadium können PCR-Produkte bei weniger oder gleich -20 ºC bis zu einer Woche gelagert werden.

SURVEYOR Nuclease-Verdau

1. Nachdem sich die Probe-PCR in Qualität und Quantität als ausreichend erwiesen hat, führen Sie die SURVEYOR Nuclease-Verdauungsreaktion wie nachstehend beschrieben durch.
2. Tauen Sie die 0,15 M MgCl2 Solution und den SURVEYOR Enhancer Cofactor auf Eis auf.
3. Fügen Sie 10,0 µL von allen obengenannten PCR-amplifizierten Proben in ein neues 0,2 mL-PCR Röhrchen oder in die Kavität einer 96-Zäpfchen-Platte.

4. Bereiten Sie aus 0,15 M MgCl2 Solution, SURVEYOR Enhancer Cofactor, SURVEYOR Enhancer W2 und SURVEYOR Nuclease W eine frische Mischung zu (SURVEYOR Nuclease Mischung).

Verwenden Sie die folgende Tabelle als Anleitung, um ein SURVEYOR Nuclease Verdau-Master-Mix von Mehrfachproben vorzubereiten. Das Beispiel unten hat die Volumen für ein 10-Proben-Mastermix.

Berücksichtigen Sie, dass ein leicht größerer Mastermix als in dieser Berechnung benötigt wird, um Verluste während des Pipettierens anzurechnen.

Anzahl der SURVEYOR Nuclease-Verdaureaktionen	**10**
Volumenberechnung:	
0,15 M MgCl2 Solution (µL)	**10.0**
SURVEYOR Enhancer Cofactor (µL)	**10.0**
SURVEYOR Enhancer W2 (µL)	**10.0**
SURVEYOR Nuclease W (µL)	**20.0**
Mastermix-Gesamtvolumen:	**50.0**
Fügen Sie jeder PCR-amplifizierten Probe **(µL**)	
5 µL SURVEYOR Nuclease Mastermix hinzu	**10.0**
Gesamtvolumen SURVEYOR Nuclease Verdaureaktion	**15.0**

a. Vor dem Gebrauch jedes Reagenz zentrifugieren.

b. Vor dem Pipettieren jedes Reagens leicht vortexen. Zentrifugieren Sie nach jedem Vortexschritt leicht ~10 Sekunden lang.

c. Fügen Sie für jede Verdauung einem 0,2 mL-PCR (oder breiteren) Mikrozentrifugenröhrchen die folgenden Komponenten hinzu.

1,0 µL 0.15 M MgCl2 Solution (PN 708027)
1,0 µL SURVEYOR Enhancer Cofactor (PN 708049)
1,0 µL SURVEYOR Enhancer W2 (PN 710161)
2,0 µL SURVEYOR Nuclease W (PN 710160)

Oder fügen Sie 5 µL Mastermix hinzu, das wie in der Tabelle oben vorbereitet wurde.

5. Vortexen Sie den SURVEYOR Nuclease Master-Mix 10 Sekunden bei niedriger Geschwindigkeit
6. Zentrifugieren Sie den SURVEYOR Nuclease Master-Mix 10 Sekunden bei niedriger Geschwindigkeit.
7. Legen Sie den SURVEYOR Nuclease Master-Mix bis zur Weiterverarbeitung auf Eis.

Anmerkung: Der in Schritt 7 vorbereitete SURVEYOR Nuclease Verdauungs-Master-Mix muss sofort verwendet werden, da SURVEYOR Nuclease W mit der Zeit inaktiv wird, wenn er in Gegenwart der anderen Komponenten des SURVEYOR Nuclease–Verdauungs-Mastermix ist.

8. Pipettieren Sie je 5,0 µL Aliquot des SURVEYOR Nuclease Master-Mix in jedes Röhrchen oder Well, das 10,0 µL Aliquot des amplifizierten PCR Produkts enthält (siehe Schritt 3 oben).
9. Wenn Sie mit dem Pipettieren fertig sind, zentrifugieren Sie die 0,2 mL-PCR Röhrchen oder 96-Näpfchen-Platten 10 Sekunden lang.
10. Vortexen Sie leicht die 0,2 mL-PCR Probenröhrchen oder die 96-Näpfchen-Platte 10 Sekunden lang.
11. Zentrifugieren Sie 10 Sekunden lang bei niedriger Geschwindigkeit (dieser Schritt ist besonders wichtig, wenn die Verdauung in einem Instrument ohne einen erhitzten Deckel durchgeführt wird).
12. Inkubieren Sie 30 Minuten lang bei 42 °C.

13. Fügen Sie jedem Röhrchen oder Näpfchen 1,0 µL Stop Solution (PN 708030) hinzu und vortexen Sie leicht (das Gesamtreaktionsvolumen der SURVEYOR Nuclease beträgt 16,0 µL).

TIPP: Die SURVEYOR Verdauungsprodukte können bei ≤ -20 ºC bis zu einer Woche gelagert werden.

14. Laden Sie die Probeverdauungen auf das WAVE *MCE* System.

Kontrollverfahren

Qualitätskontrolle des SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit *Exon 2 CE* IVD

Zur Qualitätskontrolle bestimmter Schritte des Testverfahrens sind diesem Kit Kontrollplasmid-DNAs beigefügt. Für das **Amplifikationsprotokoll** bietet diese Kontrolle die Möglichkeit zu gewährleisten, dass der Master-Mix korrekt vorbereitet ist und die Amplifikation richtig funktioniert hat. Matrizenfreie Kontrollen (wo anstelle der Matrizen-DNA Wasser hinzugefügt wird) werden ebenfalls empfohlen, um eine mögliche Kontamination der Kitkomponenten mit einer DNA-Matrize nachzuweisen.

Bei dem Schritt des SURVEYOR Nuclease-Verdaus zeigen die Amplikons dieser drei Kontrollplasmid-DNAs effektiv, ob die Bedingungen der Spaltungsreaktion (Vorbereitung des SURVEYOR Nuclease Verdauungs-Master-Mix und Inkubationsbedingungen) zufriedenstellend waren. Bei der Analyse liefern die Chromatogramme dieser SURVEYOR Nuclease verdauten Kontrollamplikons auf dem WAVE *MCE* System einen Hinweis darauf, wo die Codon 12- und 13-Mutationen auch bei niedrigem Vorkommen eluieren werden (siehe **Abbildung 2**).

Wenn die PCR Amplikons nicht den Ergebnissen in **Qualitätskontrolle von PCR -Produkten** entsprechen, sehen Sie in der **Anlage - Fehlersuche** nach oder setzen Sie sich mit dem Kundendienst von Transgenomic in Verbindung, bevor Sie weitere Schritte der Probenanalyse durchführen.

Wenn die *SURVEYOR Scan KRAS* Analyse *innerhalb der* WAVE *MCE* Viewer Software die KRAS Kontrollplasmid SURVEYOR Nuclease Verdauungsergebnisse identifiziert, erscheint ein Fehlercode. Bitte beziehen Sie sich auf die relevanten Abschnitte in **Anlage - Fehlersuche** oder setzen Sie sich mit dem Kundendienst von Transgenomic in Verbindung, bevor Sie weitere Schritte der Probenanalyse durchführen.

Verwendung der *KRAS*-Kontrollplasmid-DNAs

Mit dem Kit werden drei Kontroll-DNAs geliefert:

KRAS Control: Wild-Type Exon 2; PN 710141

KRAS Positive Control Codon 12; PN 710143

KRAS Positive Control Codon 13; PN 710144

Diese Kontroll-DNAs sind Plasmide mit Insertionen. Die Positivkontrolle enthält zwei Plasmide: ein 50:50 Gemisch aus KRAS Control: Wild-Type Exon 2 und einem Mutationsklon, der in einem Basenpaar vom Wildtyp abweicht. Die Kontrollen werden in getrennten Reagenzgefäßen geliefert, jede in einer Konzentration von 2.5 ng/µL.

Die für die PCR-Amplifikation benötigten KRAS Exon 2 Forward und Reverse Primer werden im Kit getrennt geliefert. Die Sequenz der Wild-Type und Positivkontrollen ist weiter unten abgebildet.

Die bindende Stelle des Forward-Primer ist in **Grün** hervorgehoben. Das Reverse-Complement der bindenden Stelle der Reverse Primer ist **Rot** markiert. Kodierende Regionen sind groß geschrieben und unterstrichen. Die häufigsten Mutationsregionen sind **violett** markiert. Großbuchstaben, die nicht unterstrichen sind, sind nichtkodierende exonische DNA-Bereiche.

Die Amplikonsequenz ist wie folgt:

***KRAS* Control: Wild-Type Exon 2**

NCBI Reference Sequence: NG_007524 Exon 2 loci: 10.428–10,706

Amplikongröße: 190 bp (mit Schwänzen), 153 bp (ohne Schwänze)

cgggtttgtattaaaaggtactggtggagtatttgatagtgtattaaccttatgtgtgacatgttctaa
tatagtcacattttcattatttttattataagGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGT
TGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATA
TGATCCAACAATAGAGgtaaatcttgttttaatatgcatattactggtgcaggaccattctttgataca
gataaacccg

***KRAS* Positive Control Codon 12**

NCBI Reference Sequence: NG_007524 Exon 2 loci: 10.428–10,706

Amplikongröße: 190 bp (mit Schwänzen), 153 bp (ohne Schwänze)

cgggtttgtattaaaaggtactggtggagtatttgatagtgtattaaccttatgtgtgacatgttctaa
tatagtcacattttcattatttttattataagGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGT
TGGAGCT[G/A]GTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACG
AATATGATCCAACAATAGAGgtaaatcttgttttaatatgcatattactggtgcaggaccattctttga
tacagataaacccg

***KRAS* Positive Control Codon 13**

NCBI Reference Sequence: NG_007524 Exon 2 loci: 10.428–10,706

Amplikongröße: 190 bp (mit Schwänzen), 153 bp (ohne Schwänze)

cgggtttgtattaaaaggtactggtggagtatttgatagtgtattaaccttatgtgtgacatgttctaa
tatagtcacattttcattatttttattataagGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGT
TGGAGCTGGTG[G/A]CGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACG
AATATGATCCAACAATAGAGgtaaatcttgttttaatatgcatattactggtgcaggaccattctttga
tacagataaacccg

Bitte befolgen Sie für den Gebrauch dieser Kontrollen die Anleitungen in *Amplifikationsprotokoll*, *SURVEYOR Nuclease Verdau und Analyse* des KRAS *Exon 2 CE IVD mit der* SURVEYOR Nuclease.

ES WIRD PERSONEN, DIE DIESEN TEST ERSTMALS AUSFÜHREN, DRINGEND EMPFOHLEN, ZUNÄCHST TESTS MIT KONTROLLEN DURCHZUFÜHREN, BEVOR SIE GENOMISCHE PROBEN BEARBEITEN

Interpretation der Ergebnisse

Analyse des *KRAS* Exon 2 mit der SURVEYOR Nuclease

- Beachten Sie, dass Sie zu Vergleichs- und Kontrollzwecken den SURVEYOR Nuclease Verdau **IMMER** mit Kontroll- (Wildtyp und Positivkontrollen) und Proben-DNAs und auf derselben Platte auf dem WAVE *MCE* System testen.
- Im SURVEYOR Nuclease Verdauungsstadium liefern die Amplikons dieser Kontrollplasmid DNAs eine effektive Überprüfung, ob die Bedingungen der Spaltungsreaktion (SURVEYOR Nuclease Gemischvorbereitung und Inkubationsbedingungen) zufriedenstellend waren. Im Analysestadium liefern das WAVE *MCE* System Spuren dieser verdauten Kontrollamplikons der SURVEYOR Nuclease eine Hilfe dabei, wo die DNA-Fragmente aus der Spaltung an den Mutations-Mismatch-Stellen in Codon 12 und 13, auch auf niedrigen Ebenen, eluieren (siehe ***Abbildungen*** 19-20).
- Wenn die PCR-Amplikons oder die aus den Kontrollplasmid-DNAs stammenden SURVEYOR Nuclease Spaltungsfragmente nicht den erläuterten Ergebnissen entsprechen, sehen Sie in der **Anlage - Fehlersuche** nach oder setzen Sie sich mit dem Kundendienst von Transgenomic in Verbindung, bevor Sie weitere Schritte der Probenanalyse durchführen.
- Die Beispiele unten dienen nur zu Demonstrationszwecken und dürfen **NICHT** verwendet werden, um die Identität einer gegebenen Mutation festzulegen. Die Bestätigung der Identität einer Mutation ist erforderlich, um eindeutig die Präsenz einer spezifischen Basisänderung in Codon *12* oder 13 des KRAS Gens zu bestimmen.

- **SURVEYOR Nuclease spaltet an allen Mismatches, die sich aus der Heteroduplex-Bildung zwischen Wildtyp- und mutanten DNAs und nicht nur Mutationen in Codon 12 und 13 ergeben**. Die SURVEYOR Nuclease bestätigt, dass ein Mismatch präsent ist. Falls die mutationsspezifische Basisänderungsidentität für Berichtszwecke erforderlich ist, muss die Bestätigung durch eine andere Methode wie zum Beispiel Sequenzierung erfolgen.

Beispielergebnisse

Beispiele von Ergebnissen mit dem SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit Exon 2 CE IVD mit dem WAVE MCE System zeigt die **Abbildung 2** unten. Für diese Beispiele wurde der in dem Abschnitt **Übersicht** beschriebene Prozess genau eingehalten.

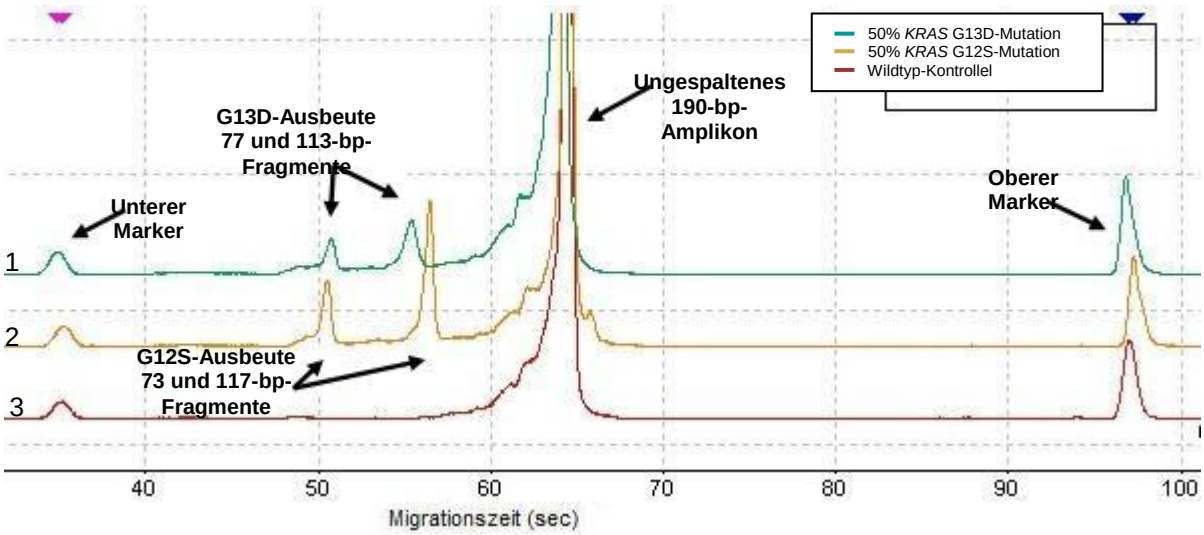


Abbildung 2: SURVEYOR Nuclease Verdauungsprodukte aus den 190-bp Exon 2 Codon 12 und 13 Amplikon-Heteroduplices, analysiert auf dem WAVE MCE System. Die in diesen Analysen verwendeten Matrizen waren (1) eine Mischung der KRAS Control: Wild-Type Exon 2 und KRAS Exon 2 Positive Control Codon 12, (2) eine Mischung aus der KRAS Control: Wild-Type Exon 2 und KRAS Exon 2 Positive Control Codon 13 und (3) der KRAS Control: Wild–Type Exon 2. Die G12S Mutation produziert G-T und A-C Heteroduplices, die nach der SURVEYOR Nuclease Verdauung 73 & 117-bp Fragmente ergeben. Die G13D Mutation produziert G-T und A-C Heteroduplices, die nach der SURVEYOR Nuclease Verdauung 77 & 113-bp Fragmente ergeben. Die Spitzen aus diesen speziellen Fragmenten sind gut getrennt.

Verwendung des WAVE MCE Viewers für den SURVEYOR Scan Aufruf

Das WAVE MCE System wird mit der WAVE MCE Kontrollsoftware und der WAVE MCE Viewer Software geliefert. Die Kontrollsoftware wird verwendet, um Proben auf dem WAVE MCE System einzustellen und laufen zu lassen. Die Viewer Software wird zur Datenüberprüfung, Elektropherogramm-Verarbeitung und zur Report-Erzeugung verwendet. Innerhalb der Viewer Software wird eine KRAS Analysefunktion verwendet, um Analysten dabei zu helfen, die Präsenz einer Mutation zu identifizieren. Diese Informationen werden in den SURVEYOR Scan Reports für die KRAS Analyse zusammen mit dem Datenüberprüfungsstatus geliefert.

Beachten Sie, dass ein positives SURVEYOR SCAN Ergebnis aus der WAVE MCE Viewer Software NICHT die Mutationsidentität bestätigt. Probenqualität, nicht-standardmäßige Durchlaufbedingungen und die Chip-Bedingung können die Ergebnisgenauigkeit beeinflussen. Zusätzlich gibt es sehr seltene Mutationen in anderen Codons als in 12 und 13, z.B. in den Codons 11 und 14 die beim SURVEYOR SCAN als positiv bewertet werden können. Falls die Sequenz einer KRAS Exon 2-Mutation benötigt wird, ist eine Bestätigung aller positiven Resultate durch DNA-Sequenzierung oder einer vergleichbaren Methode erforderlich.

SURVEYOR Scan Aufrufverfahren

1. Lassen Sie den KRAS Probensatz auf dem WAVE MCE System laufen und verwenden Sie dazu die unten aufgeführte 96-Näpfchen-Anordnung.
   a. Wählen Sie in der Kontrollsoftware Probeneingabe -> Neu
   b. Wählen Sie in Probeneingabe – Neues Fenster das SURVEYOR_Scan Projekt und klicken Sie auf die OK Taste.
   c. Standardmäßig wird das KRAS Exon 2 Probenfach-Layout in das Proben-Eingangsfenster geladen. Eine Ladder für jeden der vier Chips und die Exon 2 Kontrollen wird automatisch befüllt. Wenn keines der Chips verwendet wird, entfernen Sie die dazugehörigen Ladder. Geben Sie die gewünschten Proben in die verbliebenen Öffnungen.
   d. Wenn das Probeneingabeformular befüllt ist, klicken Sie auf die Enter Taste, um das Fach zu schaffen. Lassen Sie die Proben auf dem Instrument laufen. Sehen Sie im **WAVE MCE System Bedienungshandbuch** für Details über den Betrieb der Instrumente nach.

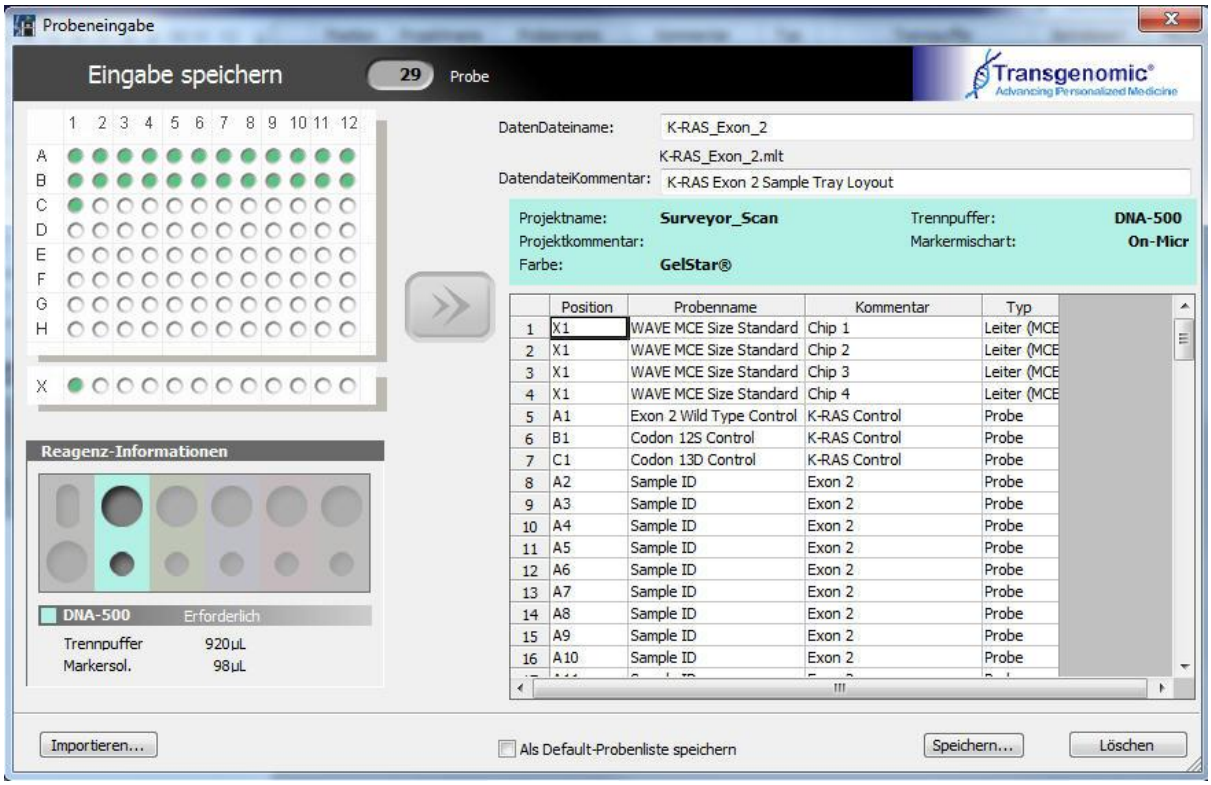


Abbildung 3: Probenfach-Setup

2. Wenn alle Proben auf dem WAVE MCE System gelaufen sind, öffnen Sie die WAVE MCE Betrachter-Applikation unter Verwendung einer der folgenden Methoden.

   a. Klicken Sie auf das WAVE MCE Viewer Symbol auf dem Desktop.

   b. Wählen Sie Start -> WAVE MCE -> WAVE MCE Viewer

   [Auf die WAVE MCE Viewer Software kann ebenso von der WAVE MCE Control Software während der Datenerfassung zugegriffen werden, wenn Sie auf das Symbol Ansicht→ Datendatei klicken].

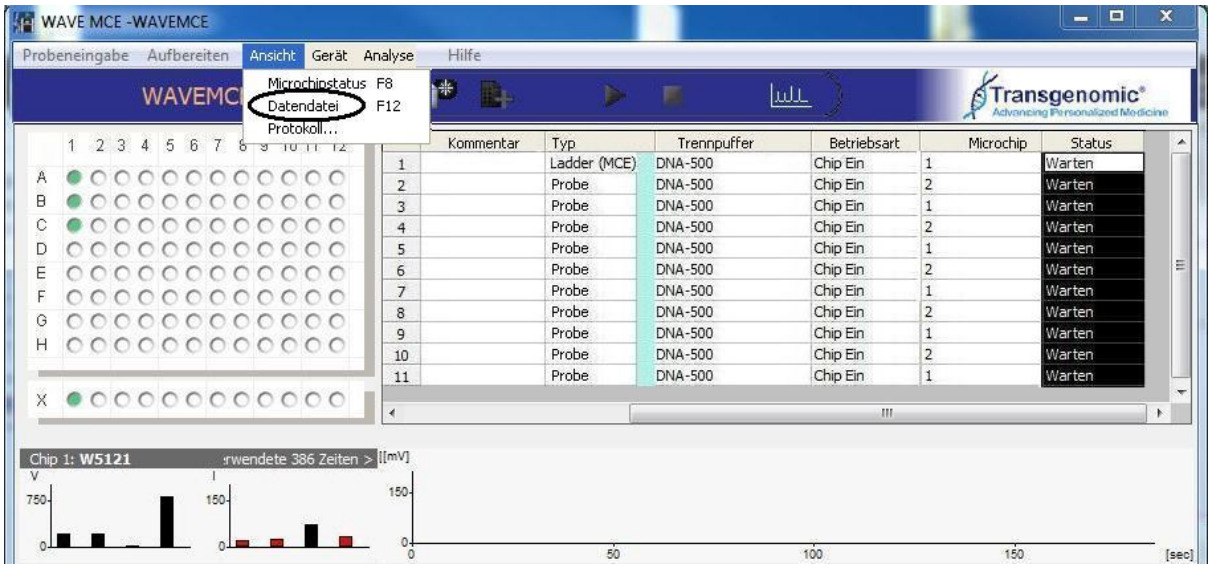


Abbildung 4: Zugriff auf die WAVE *MCE* Viewer Software

Die WAVE *MCE* Viewer Applikation öffnet sich, wie in **Abbildung 5** gezeigt.

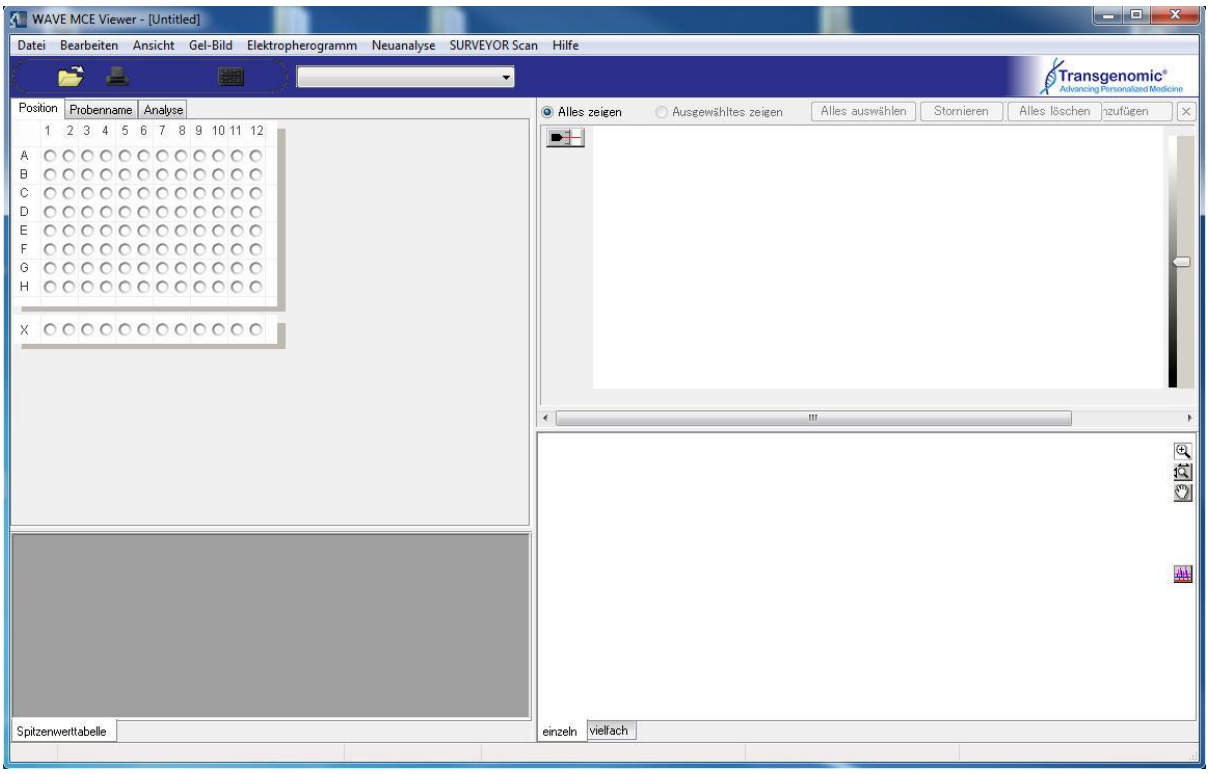


Abbildung 5: WAVE MCE Viewer

3 Öffnen Sie die Injektions- (MLT) Datei im WAVE MCE Viewer. Wählen Sie Datei -> Öffnen… Wählen Sie dann die gewünschte Datei und drücken Sie auf die Taste „Öffnen“.

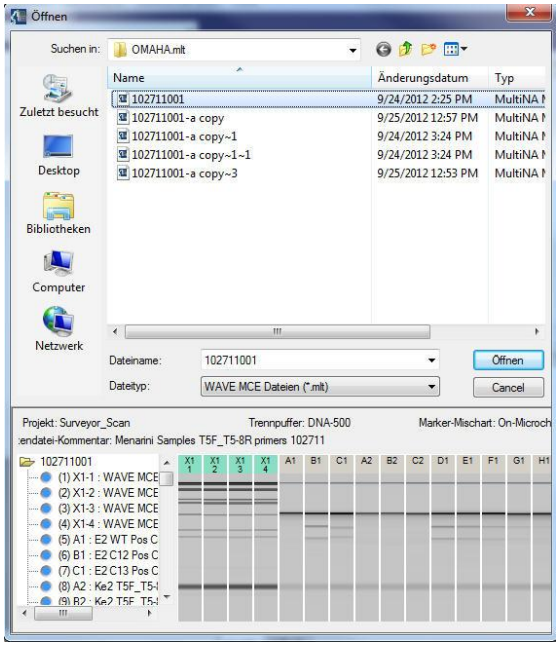


Abbildung 6: MLT Dateidialog öffnen

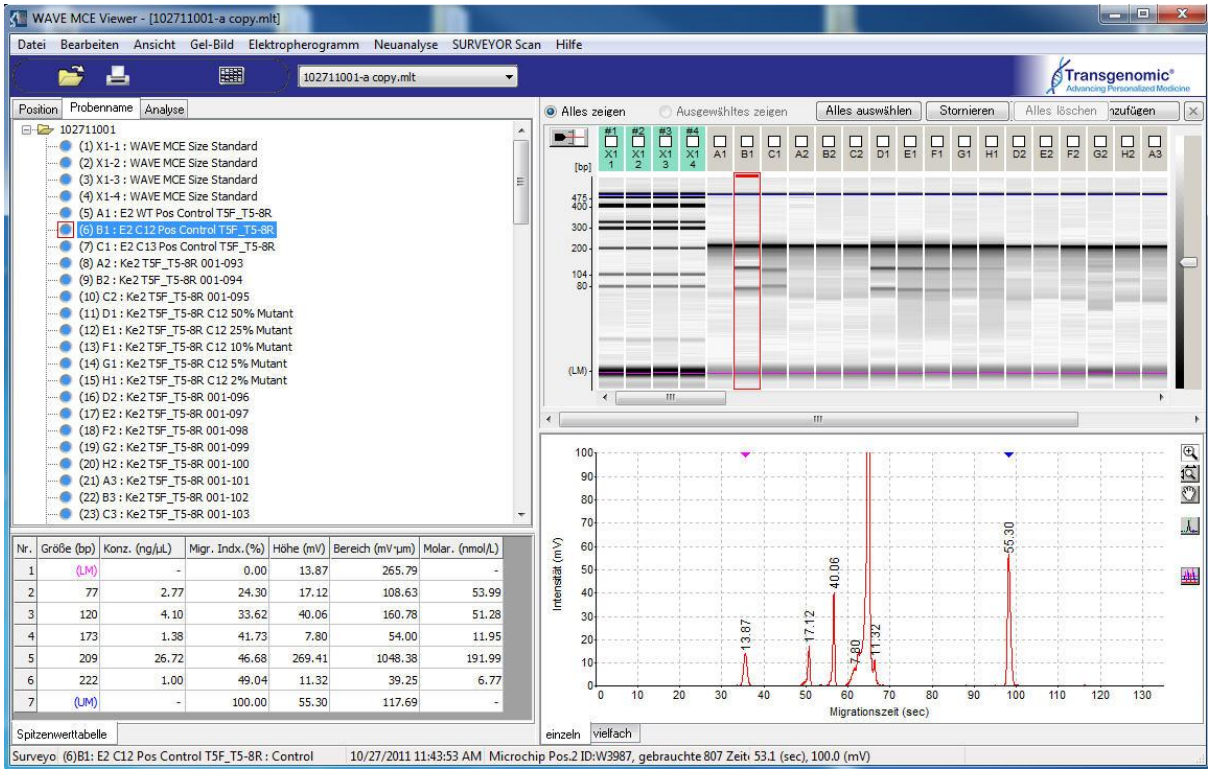

WAVE MCE Viewer - [102711001-a copy.mlt]
Datei Bearbeiten Ansicht Gel-Bild Elektropherogramm Neuanalyse SURVEYOR Scan Hilfe
Transgenomic
Position Probenname Analyse
102711001
(1) X1-1 : WAVE MCE Size Standard
(2) X1-2 : WAVE MCE Size Standard
(3) X1-3 : WAVE MCE Size Standard
(4) X1-4 : WAVE MCE Size Standard
(5) A1 : E2 WT Pos Control T5F_T5-8R
(6) B1 : E2 C12 Pos Control T5F_T5-8R
(7) C1 : E2 C13 Pos Control T5F_T5-8R
(8) A2 : Ke2 T5F_T5-8R 001-093
(9) B2 : Ke2 T5F_T5-8R 001-094
(10) C2 : Ke2 T5F_T5-8R 001-095
(11) D1 : Ke2 T5F_T5-8R C12 50% Mutant
(12) E1 : Ke2 T5F_T5-8R C12 25% Mutant
(13) F1 : Ke2 T5F_T5-8R C12 10% Mutant
(14) G1 : Ke2 T5F_T5-8R C12 5% Mutant
(15) H1 : Ke2 T5F_T5-8R C12 2% Mutant
(16) D2 : Ke2 T5F_T5-8R 001-096
(17) E2 : Ke2 T5F_T5-8R 001-097
(18) F2 : Ke2 T5F_T5-8R 001-098
(19) G2 : Ke2 T5F_T5-8R 001-099
(20) H2 : Ke2 T5F_T5-8R 001-100
(21) A3 : Ke2 T5F_T5-8R 001-101
(22) B3 : Ke2 T5F_T5-8R 001-102
(23) C3 : Ke2 T5F_T5-8R 001-103
Alles zeigen
Ausgewähltes zeigen
Alles auswählen
Stornieren
Alles löschen
Nr. Größe (bp) Konz. (ng/µL) Migr. Indx.(%) Höhe (mV) Bereich (mV*µm) Molar. (nmol/L)
1 (LM) - 0.00 13.87 265.79 -
2 77 2.77 24.30 17.12 108.63 53.99
3 120 4.10 33.62 40.06 160.78 51.28
4 173 1.38 41.73 7.80 54.00 11.95
5 209 26.72 46.68 269.41 1048.38 191.99
6 222 1.00 49.04 11.32 39.25 6.77
7 (UM) - 100.00 55.30 117.69 -
Spitzenwerttabelle
Intensität (mV)
Migrationszeit (sec)
13.87
17.12
40.06
7.80
11.32
55.30
einzeln
vielfach
Surveyo (6)B1: E2 C12 Pos Control T5F_T5-8R : Control
10/27/2011 11:43:53 AM Microchip Pos.2 ID:W3987, gebrauchte 807 Zeit 53.1 (sec), 100.0 (mV)

Abbildung 7: Beispiel der geladenen MLT Datendatei

4 Die Proben werden in die Viewer-Software geladen. Wenn die Proben zum ersten Mal geladen werden, erscheint ein Prompt, das den Benutzer auffordert, die Analyse laufen zu lassen. Siehe **Abbildung 8**.

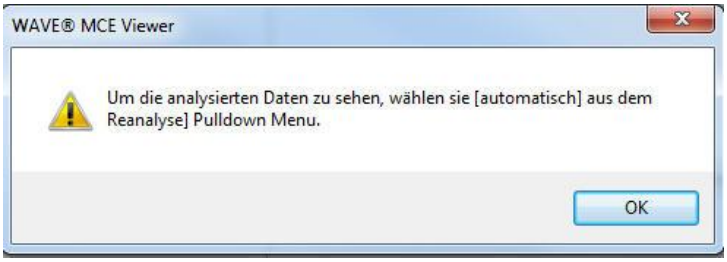


Abbildung 8: die Analyse laufen lassen

5 Wählen Sie erneute Analyse → Automatisch… um die Spitzenermittlungsanalyse laufen zu lassen. Lassen Sie die Standardanalyse (**Abbildung** 9) laufen und wählen Sie dazu die [Standard] Option. Klicken Sie auf [erneute Analyse] und [Automatisch]. Dies ermittelt die Spitzen in jedem Elektropherogramm in Bezug auf den verwendeten Ladder (WAVE MCE Optimized DNA Size Standard) bei der Vorbereitung der SURVEYOR Scan KRAS Analyse.

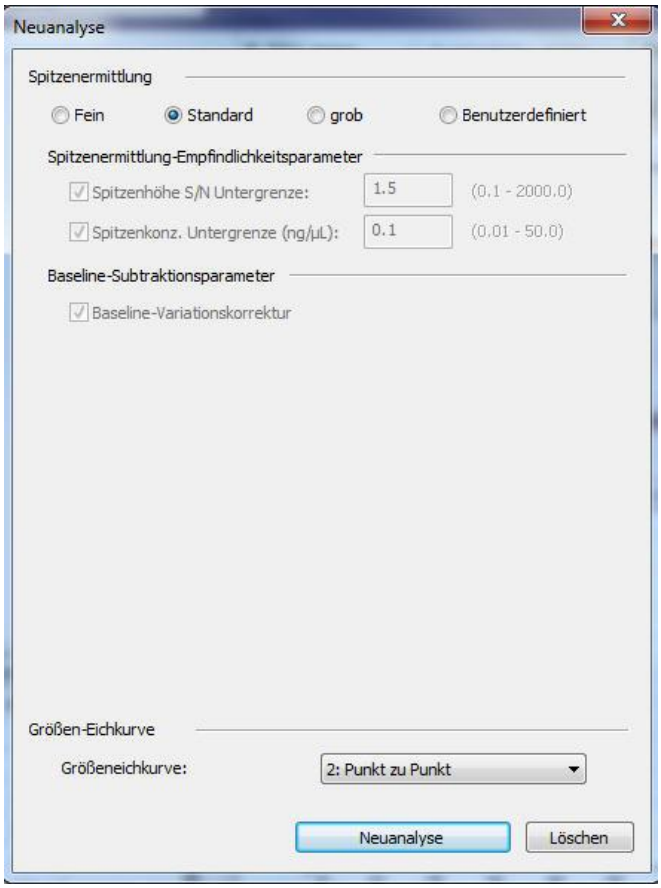


Abbildung 9: Spitzenanalyse

6. Lassen Sie die spezifische *KRAS* Analyse laufen und wählen Sie dazu *SURVEYOR Scan* → KRAS Analyse.

    a. In der *KRAS* Analyse Dialogbox sind die Default Well Orte für die Kontrollen die folgenden:

    A1 = *KRAS* Control: Wild-Type Exon 2
    B1 = *KRAS* Exon 2 Positive Control Codon 12
    C1 = *KRAS* Exon 2 Positive Control Codon 13

    b. Wenn der Benutzer diese Kontrollen in andere Quellen als die oben angegebenen setzt, wählen Sie die neuen Öffnungspositionen von der Drop-down-Selektion aus.

    c. Geben Sie den Namen des Prüfers ein. Dieser Name wird in allen Berichten zusammen mit den SURVEYOR Call Berichten enthalten sein. Klicken Sie abschließend auf die [Analyse ausführen] Taste.

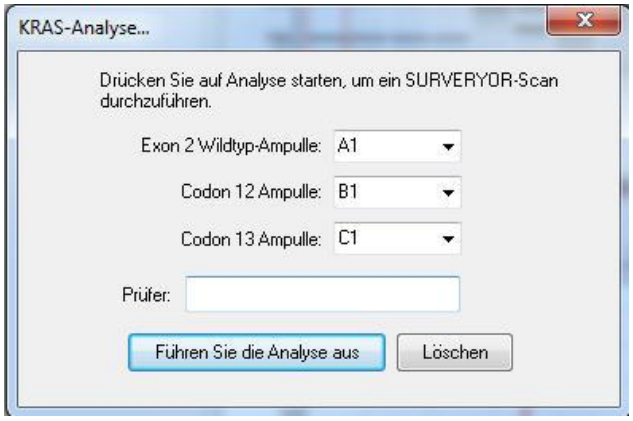


Abbildung 10: *KRAS* Analyse

7 Die Ergebnisse erscheinen auf der SURVEYOR Call Tabelle (siehe **Abbildung 11** für ein Beispiel). Die möglichen Felder werden in der Tabelle unten beschrieben.

Feld	**Inhalt**
Näpfchen	Die Kavitätenposition der Probe
Probenname	Der Name der Probe
SURVEYOR Call	Der von der Software abgeleitete Aufruf aus dem Vergleich der unbekannten Proben mit den Kontrollen. Die möglichen SURVEYOR Call Ergebnisse beinhalten: SURVEYOR Scan **positiv** – Genetische Variation ermittelt **SURVEYOR Scan negativ** – Genetische Variation nicht ermittelt **Unbekannt** – in dem interessierenden Bereich befinden sich zu viele Spitzen, und die Software ist nicht in der Lage, ein SURVEYOR Scan Ergebnis festzulegen. Die Proben-Aufrufe sind auch farbbasierend auf dem SURVEYOR Scan Ergebnis. **Rot** gibt an, dass eine genetische Variation ermittelt wurde, und **grün** gibt an, dass keine genetische Variation (vom Wild-Type) ermittelt wurde.
MCE-Score	Die MCE-Score stammt aus der Verwendung der Spitzencharakteristiken für jedes SURVEYOR Scan Ergebnis. Diese Auswertung basiert auf der Signalintensität und dem Hintergrundlevel. Die Auswertung liegt zwischen 0-100. Je höher die Bewertungsziffer ist, desto mehr stimmt die unbekannte Probe mit dem erwarteten Muster einer mutanten Variation überein.
Ratio	Das Verhältnis zwischen der Spitzenhöhe des genetischen Variantenschnittfragments und der Spitzenhöhe des Wildtyp-Fragments (ungeschnitten).

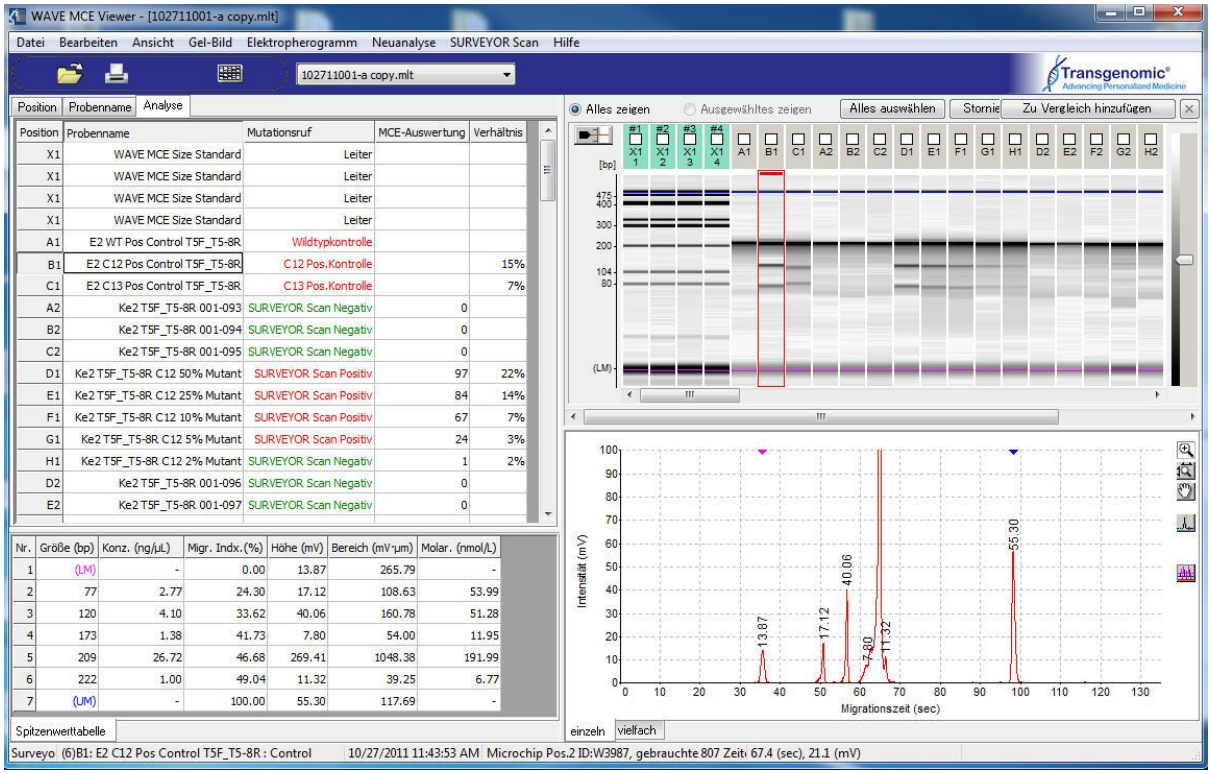

WAVE MCE Viewer - [102711001-a copy.mlt]
Datei Bearbeiten Ansicht Gel-Bild Elektropherogramm Neuanalyse SURVEYOR Scan Hilfe
102711001-a copy.mlt
Transgenomic
Position Probenname Analyse
Alles zeigen
Ausgewähltes zeigen
Alles auswählen
Zu Vergleich hinzufügen
Position | Probenname | Mutationsruf | MCE-Auswertung | Verhältnis
X1 WAVE MCE Size Standard Leiter
A1 E2 WT Pos Control T5F_T5-8R Wildtypkontrolle
B1 E2 C12 Pos Control T5F_T5-8R C12 Pos.Kontrolle 15%
C1 E2 C13 Pos Control T5F_T5-8R C13 Pos.Kontrolle 7%
A2 Ke2 T5F_T5-8R 001-093 SURVEYOR Scan Negativ 0
B2 Ke2 T5F_T5-8R 001-094 SURVEYOR Scan Negativ 0
C2 Ke2 T5F_T5-8R 001-095 SURVEYOR Scan Negativ 0
D1 Ke2 T5F_T5-8R C12 50% Mutant SURVEYOR Scan Positiv 97 22%
E1 Ke2 T5F_T5-8R C12 25% Mutant SURVEYOR Scan Positiv 84 14%
F1 Ke2 T5F_T5-8R C12 10% Mutant SURVEYOR Scan Positiv 67 7%
G1 Ke2 T5F_T5-8R C12 5% Mutant SURVEYOR Scan Positiv 24 3%
H1 Ke2 T5F_T5-8R C12 2% Mutant SURVEYOR Scan Negativ 1 2%
D2 Ke2 T5F_T5-8R 001-096 SURVEYOR Scan Negativ 0
E2 Ke2 T5F_T5-8R 001-097 SURVEYOR Scan Negativ 0
Nr. | Größe (bp) | Konz. (ng/µL) | Migr. Indx.(%) | Höhe (mV) | Bereich (mV·µm) | Molar. (nmol/L)
1 (LM) - 0.00 13.87 265.79 -
2 77 2.77 24.30 17.12 108.63 53.99
3 120 4.10 33.62 40.06 160.78 51.28
4 173 1.38 41.73 7.80 54.00 11.95
5 209 26.72 46.68 269.41 1048.38 191.99
6 222 1.00 49.04 11.32 39.25 6.77
7 (UM) - 100.00 55.30 117.69 -
Spitzenwerttabelle
Intensität (mV)
Migrationszeit (sec)
13.87
17.12
40.06
7.80
11.32
55.30
einzeln vielfach
Surveyo (6)B1: E2 C12 Pos Control T5F_T5-8R : Control
10/27/2011 11:43:53 AM Microchip Pos.2 ID:W3987, gebrauchte 807 Zeit 67.4 (sec), 21.1 (mV)

Abbildung 11: SURVEYOR Call Ergebnisse

8 Datenprüfung: *KRAS* SURVEYOR Call Ergebnisse

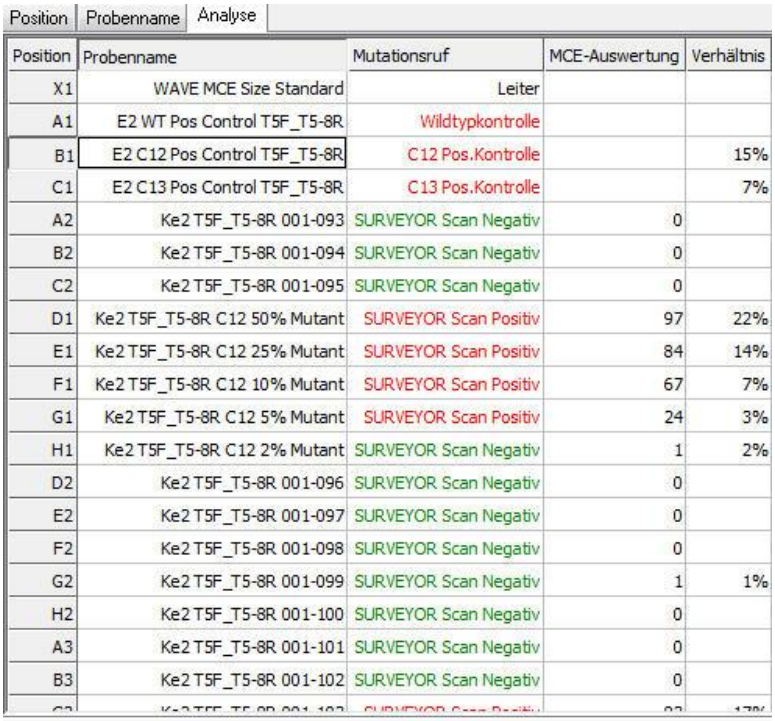
a Überprüfen Sie jedes in der Probentabelle präsentierte Ergebnis, indem Sie den Probennamen mit dem SURVEYOR Call in Verbindung bringen. Für jedes SURVEYOR Scan Ergebnis werden eine MCE Auswertung und Ratio für die Probe berechnet.

b Wählen Sie zuerst die Quelle in der Probentabelle unter der SURVEYOR Aufruftabelle, wie in **Abbildung 11** oben gezeigt. Das Elektropherogramm und Gelbild für die Probe werden angezeigt. Prüfen Sie das Elektropherogramm unter Verwendung der graphischen Softwarefunktionen. Falls erforderlich, zoomen Sie in den interessierenden Bereich und überlappen Sie das Elektropherogramm mit der Exon 2 Wild-Type Kontrolle.

c Notieren Sie alle Unterschiede zwischen der Wild-Type Kontrolle und der analysierten Probe.

d Überlappen Sie als nächstes die Exon 2 Codon 12 Positive Control und Exon 2 Codon 13 Positive Control mit der Probe. Notieren Sie alle beobachteten Unterschiede.

e Durch Verwendung dieser Tools kann der Datenprüfer dann die Präsenz oder Abwesenheit einer genetischen Variation beurteilen, indem er die MCE Auswertung und ihre dazugehörige Ratio für jede Probe mit der der Exon 2 Kontrollen vergleicht. Die Ratio wird als die Summe der mutanten Spitzenhöhen, geteilt durch die Höhe der ungeschnittenen Exon 2 Wildtyp-Spitze definiert. Die Ratio wird nur für jene Proben berechnet und angezeigt, die einen SURVEYOR Call haben. Als „Unbekannt“ bezeichnete Proben haben weder eine MCE Auswertung noch eine Ratio.



Position | Probenname | Analyse

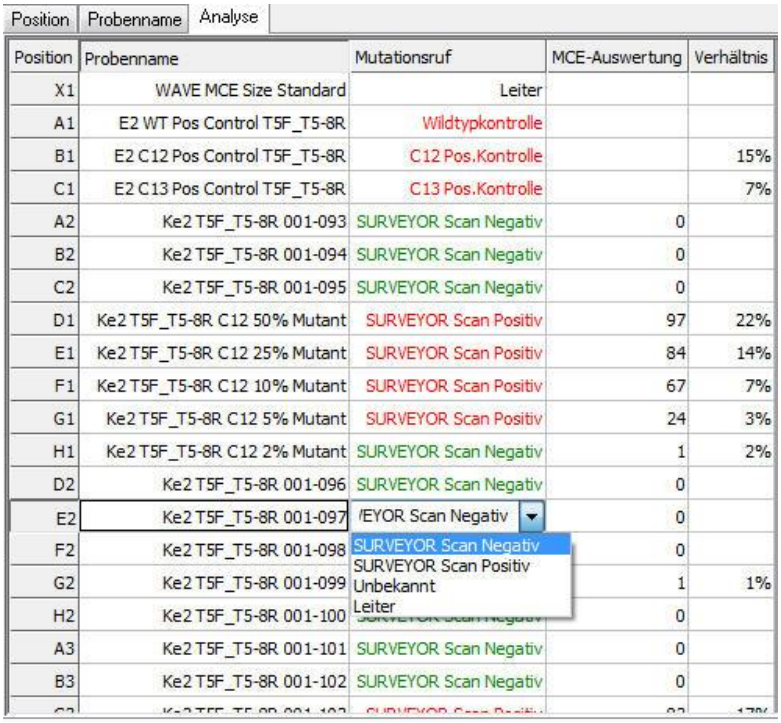
Position	Probenname	Mutationsruf	MCE-Auswertung	Verhältnis
X1	WAVE MCE Size Standard	Leiter		
A1	E2 WT Pos Control T5F_T5-8R	Wildtypkontrolle		
B1	E2 C12 Pos Control T5F_T5-8R	C12 Pos.Kontrolle		15%
C1	E2 C13 Pos Control T5F_T5-8R	C13 Pos.Kontrolle		7%
A2	Ke2 T5F_T5-8R 001-093	SURVEYOR Scan Negativ	0	
B2	Ke2 T5F_T5-8R 001-094	SURVEYOR Scan Negativ	0	
C2	Ke2 T5F_T5-8R 001-095	SURVEYOR Scan Negativ	0	
D1	Ke2 T5F_T5-8R C12 50% Mutant	SURVEYOR Scan Positiv	97	22%
E1	Ke2 T5F_T5-8R C12 25% Mutant	SURVEYOR Scan Positiv	84	14%
F1	Ke2 T5F_T5-8R C12 10% Mutant	SURVEYOR Scan Positiv	67	7%
G1	Ke2 T5F_T5-8R C12 5% Mutant	SURVEYOR Scan Positiv	24	3%
H1	Ke2 T5F_T5-8R C12 2% Mutant	SURVEYOR Scan Negativ	1	2%
D2	Ke2 T5F_T5-8R 001-096	SURVEYOR Scan Negativ	0	
E2	Ke2 T5F_T5-8R 001-097	SURVEYOR Scan Negativ	0	
F2	Ke2 T5F_T5-8R 001-098	SURVEYOR Scan Negativ	0	
G2	Ke2 T5F_T5-8R 001-099	SURVEYOR Scan Negativ	1	1%
H2	Ke2 T5F_T5-8R 001-100	SURVEYOR Scan Negativ	0	
A3	Ke2 T5F_T5-8R 001-101	SURVEYOR Scan Negativ	0	
B3	Ke2 T5F_T5-8R 001-102	SURVEYOR Scan Negativ	0	

Abbildung 12: Beispiele für SURVEYOR Call Ergebnisse

f Wichtig! Siehe **Manuelle Prüfung der MCE-Score = 1 Resultat** für Beispiele einer manuellen Prüfung von Proben mit einem MCE-Score =1 und einer Ratio ≤ 5 %.

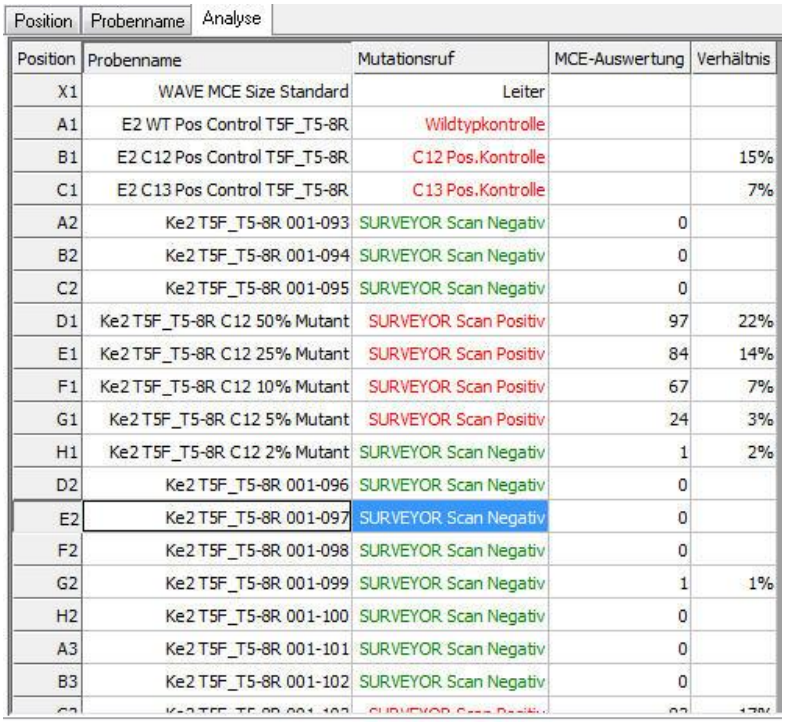
g **Wichtig!** Für eine sorgfältige Prüfung jeder Probe sollte der Prüfer kontrollieren, ob nebeneinander liegende Proben in der Analyseplatte identische positive SURVEYOR Scan Ergebnisse haben. Wenn identische positive Ergebnisse auftreten, können Sie das Ergebnis der Proben- oder Kreuzkontrollkontamination sein, und die Analyse muss wiederholt werden.

h **Wichtig!** Für eine sorgfältige Prüfung jeder Probe hat der Prüfer die Möglichkeit, das SURVEYOR Scan Ergebnis zu ändern, wenn er das SURVEYOR Aufruf Drop-Down Menu verwendet. Alle manuellen Änderungen an der Analysesoftware SURVEYOR Aufruf werden auf den Probeberichten notiert. Die MCE Score wird auf „Manuell“ aktualisiert, um anzugeben, dass der Prüfer eine Änderung manuell durchführte (siehe das folgende Beispiel für Probe 4553/11 in Kavität C2)



Position	Probenname	Mutationsruf	MCE-Auswertung	Verhältnis
X1	WAVE MCE Size Standard	Leiter		
A1	E2 WT Pos Control T5F_T5-8R	Wildtypkontrolle		
B1	E2 C12 Pos Control T5F_T5-8R	C12 Pos.Kontrolle		15%
C1	E2 C13 Pos Control T5F_T5-8R	C13 Pos.Kontrolle		7%
A2	Ke2 T5F_T5-8R 001-093	SURVEYOR Scan Negativ	0	
B2	Ke2 T5F_T5-8R 001-094	SURVEYOR Scan Negativ	0	
C2	Ke2 T5F_T5-8R 001-095	SURVEYOR Scan Negativ	0	
D1	Ke2 T5F_T5-8R C12 50% Mutant	SURVEYOR Scan Positiv	97	22%
E1	Ke2 T5F_T5-8R C12 25% Mutant	SURVEYOR Scan Positiv	84	14%
F1	Ke2 T5F_T5-8R C12 10% Mutant	SURVEYOR Scan Positiv	67	7%
G1	Ke2 T5F_T5-8R C12 5% Mutant	SURVEYOR Scan Positiv	24	3%
H1	Ke2 T5F_T5-8R C12 2% Mutant	SURVEYOR Scan Negativ	1	2%
D2	Ke2 T5F_T5-8R 001-096	SURVEYOR Scan Negativ	0	
E2	Ke2 T5F_T5-8R 001-097	/EYOR Scan Negativ	0	
F2	Ke2 T5F_T5-8R 001-098	SURVEYOR Scan Negativ	0	
G2	Ke2 T5F_T5-8R 001-099	SURVEYOR Scan Positiv	1	1%
H2	Ke2 T5F_T5-8R 001-100	Unbekannt	0	
A3	Ke2 T5F_T5-8R 001-101	Leiter	0	
B3	Ke2 T5F_T5-8R 001-102	SURVEYOR Scan Negativ	0	

Abbildung 13: Prüfer nimmt eine Veränderung am SURVEYOR-Aufruf vor



Position	Probenname	Mutationsruf	MCE-Auswertung	Verhältnis
X1	WAVE MCE Size Standard	Leiter		
A1	E2 WT Pos Control T5F_T5-8R	Wildtypkontrolle		
B1	E2 C12 Pos Control T5F_T5-8R	C12 Pos.Kontrolle		15%
C1	E2 C13 Pos Control T5F_T5-8R	C13 Pos.Kontrolle		7%
A2	Ke2 T5F_T5-8R 001-093	SURVEYOR Scan Negativ	0	
B2	Ke2 T5F_T5-8R 001-094	SURVEYOR Scan Negativ	0	
C2	Ke2 T5F_T5-8R 001-095	SURVEYOR Scan Negativ	0	
D1	Ke2 T5F_T5-8R C12 50% Mutant	SURVEYOR Scan Positiv	97	22%
E1	Ke2 T5F_T5-8R C12 25% Mutant	SURVEYOR Scan Positiv	84	14%
F1	Ke2 T5F_T5-8R C12 10% Mutant	SURVEYOR Scan Positiv	67	7%
G1	Ke2 T5F_T5-8R C12 5% Mutant	SURVEYOR Scan Positiv	24	3%
H1	Ke2 T5F_T5-8R C12 2% Mutant	SURVEYOR Scan Negativ	1	2%
D2	Ke2 T5F_T5-8R 001-096	SURVEYOR Scan Negativ	0	
E2	Ke2 T5F_T5-8R 001-097	SURVEYOR Scan Negativ	0	
F2	Ke2 T5F_T5-8R 001-098	SURVEYOR Scan Negativ	0	
G2	Ke2 T5F_T5-8R 001-099	SURVEYOR Scan Negativ	1	1%
H2	Ke2 T5F_T5-8R 001-100	SURVEYOR Scan Negativ	0	
A3	Ke2 T5F_T5-8R 001-101	SURVEYOR Scan Negativ	0	
B3	Ke2 T5F_T5-8R 001-102	SURVEYOR Scan Negativ	0	

Abbildung 14: Am SURVEYOR-Aufruf vorgenommen Veränderung

9 Der SURVEYOR-Aufruf und die MCE-Score erscheinen in den folgenden Berichten:

a 120 Proben/Seite Probenblatt

b 24 Proben/SeiteProbenblatt

c 12 Probe/Seite Elektropherogramm, Gelbild

d 12 Probe/Seite Ergebnistabelle, Gelbild

e 1 Probe/Seite Elektropherogramm, Ergebnistabelle

f Überlappung Elektropherogramm

Zum Erstellen eines Berichts wählen Sie Datei → Drucken… Das Druckdialogfenster (**Abbildung 15**) erscheint. Wählen Sie den gewünschten Bericht und klicken Sie auf [Vorschau], um den Bericht vor dem Drucken anzusehen. Drücken Sie auf die [Drucken…] Taste, um den Bericht zum Drucker zu senden.

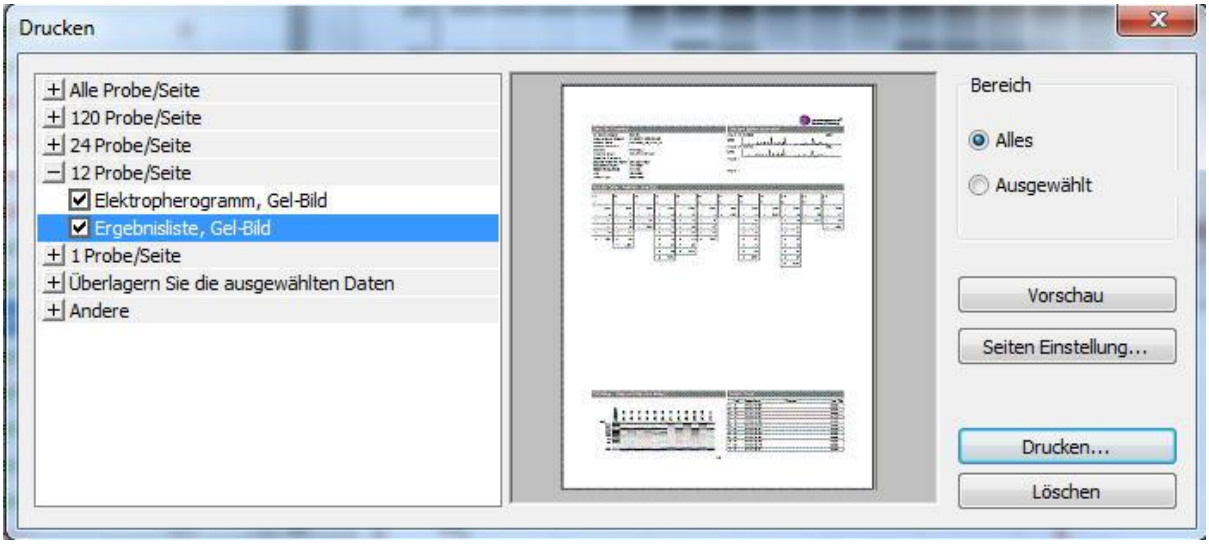


Abbildung 15: Druckdialog

Abbildung 16 zeigt ein Beispiel eines Überlappungs-Elektropherogramm-Berichts mit einer Zusammenfassung von Analyseresultaten des SURVEYOR Scans.

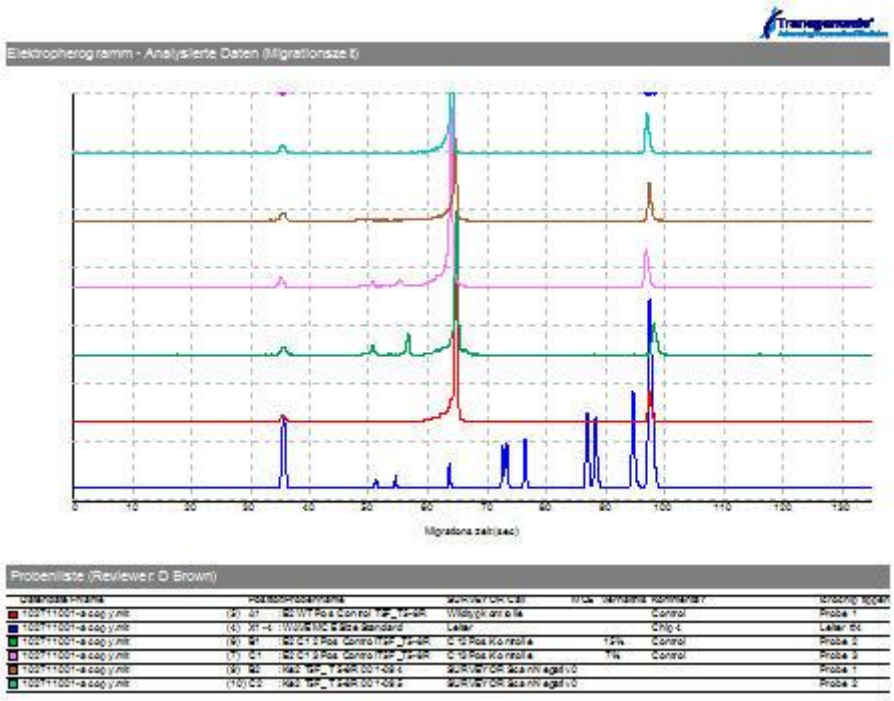


Abbildung 16: Überlagerungs-Elektropherogramm-Bericht

Manuelle Prüfung von WAVE *MCE* Gelbildern und Elektropherogrammen

Der Prüfer sollte die Gelbilder und Elektropherogramme für alle Proben als eine zusätzliche Verifizierung visuell kontrollieren und dazu das Verfahren der KRAS-Analyse-Software befolgen. Dies ist besonders wichtig, wenn:

- ein negatives SURVEYOR-Scan-Resultat mit einem MCE-Score =1 und einer Ratio von ≤ 5 % vorliegt. Solche Bewertungen können auf eine sehr niedrigstufige Mutation hinweisen, wobei aufgrund von Basislinien-Rauschen die Software nicht in der Lage ist, einen Aufruf als SURVEYOR Scan-positiv vorzunehmen.
- entschieden wird, ein SURVEYOR Scan–Resultat manuell zu ändern. Der Vergleich der SURVEYOR Nuclease Verdauungen der unbekannten Probe mit den Verdauungen der positive und Wildtypkontrolle fügt jenen Proben eine zusätzliche Verifizierung hinzu, die sequenziert werden müssen. Wenn Proben Verdauungsspitzen auf niedrigem Niveau haben, sollten Sie durch DNA Sequenz bestätigt werden.

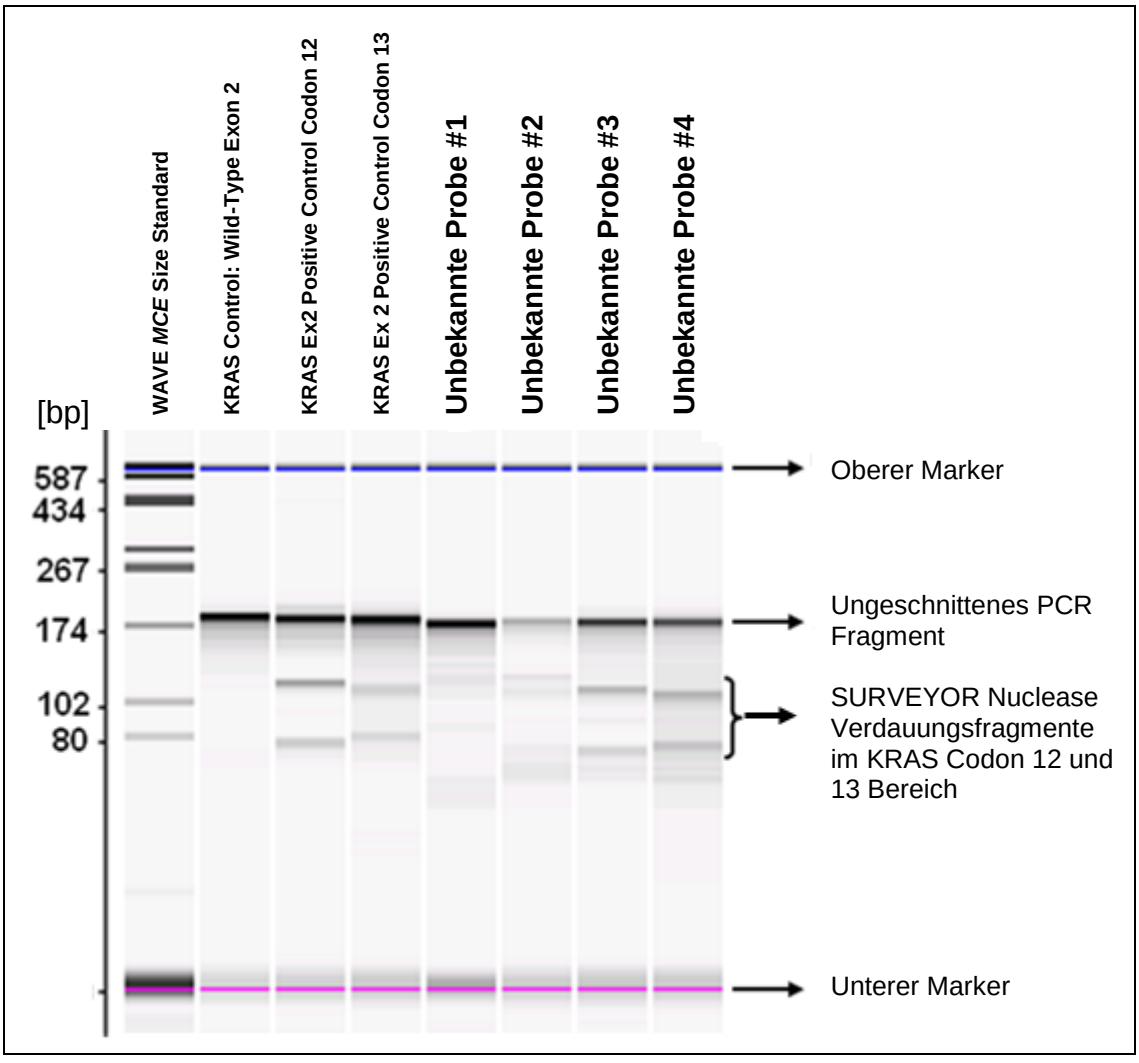


Abbildung 17: Ein **WAVE *MCE*** Gelbild der SURVEYOR Nuclease **Verdauungsfragmente im Anschluss an die PCR Amplifikation von *KRAS* Exon 2**. Eine Sichtkontrolle zeigt zwei Teilungsbande in den unbekannten Proben #3 und #4, die den Bandmustern für die positiven Kontrollen entsprechen. Die unbekannte Probe #1 zeigt nur schwache nichtspezifische Bande. Die unbekannte Probe #2 kann zwei niedrige Konzentrationsbande entsprechend den positiven

Kontrollen haben. Die unbekannten Proben #2, #3 und #4 sollten zu einer DNA-Sequenzbestätigung gesandt werden.

Zusammen mit einer Sichtkontrolle der Gelbilder kann es nützlich sein, die Proben-Elektropherogramme mit den positiven und Wildtypkontrollen zu vergleichen, die im Kit mitgeliefert werden. Es ist am besten, das „Overlay" Merkmal für die Elektropherogramme zu verwenden. Für die Parameter der X-Achse kann entweder „Migration" oder „Größe" verwendet werden. **Abbildung 18** unten zeigt die Elektropherogramme für die Proben, die in der Betriebsart Gelbild oben angesehen wurden (**Abbildung 17**).

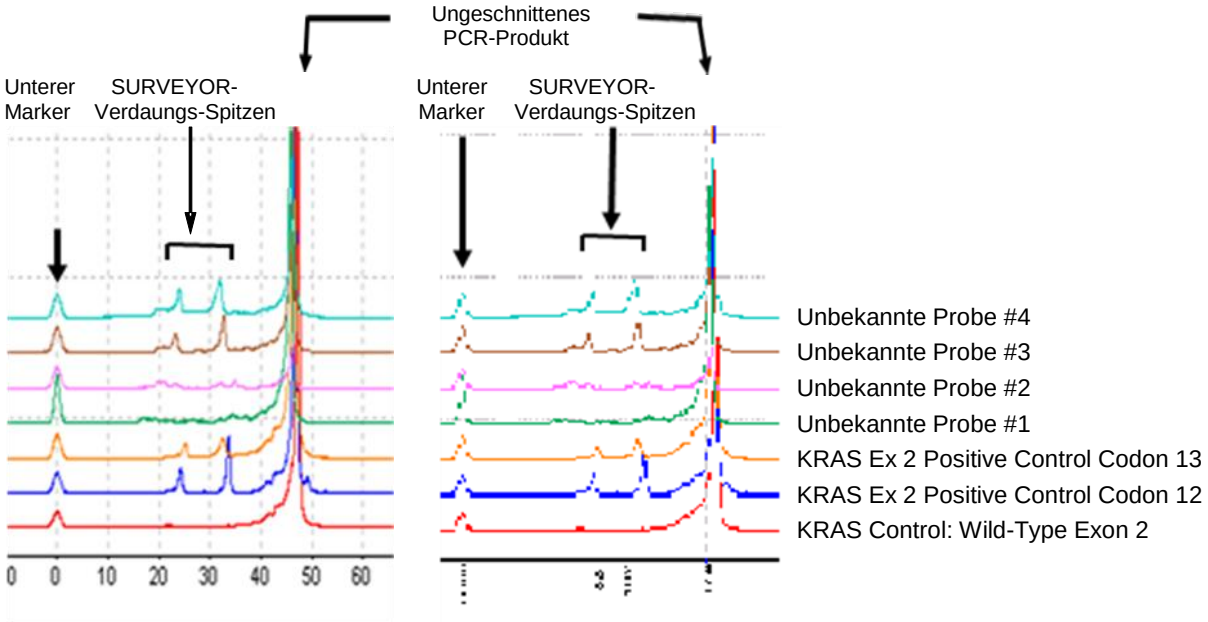


Abbildung 18: Die Elektropherogramme desselben Probensatzes, die auf dem Gelbild in *Abbildung 17* visualisiert wird, wird durch Gebrauch des Migrationsindexes und der Größenkennzeichnung für die X-Achse angezeigt. In diesem Fall ist es klar, dass die Spitzenmuster in den unbekannten Proben #3 und #4 den Spitzenmustern entsprechen, die für die mit dem Kit mitgelieferten positiven Kontrollen beobachtet werden. Die DNA-Sequenzbestätigung ist als Identifizierung dieser spezifischen Basisänderung erforderlich. Eine Sichtkontrolle der Elektropherogramme der unbekannten Probe #1 zeigt, dass eine Niveau-Basislinie und DNA-Sequenzbestätigung nicht erforderlich sind. Die Sichtkontrolle des Elektropherogramms für die unbekannte Probe #2 zeigt zwei Bereiche, in denen es möglicherweise Teilungs-Spitzensignale gibt, und da diese Bereiche der Position den Verdauungsspitzen der positiven Kontrolle entsprechen, sollte diese Probe zur DNA-Sequenzbestätigung gesandt werden.

Manuelle Prüfung des MCE-Score = 1 Resultat

Proben mit einem negativen SURVEYOR-Scan-Resultat, aber mit einem MCE-Score = 1 (und einer Ratio von ≤ 5 %) sollten manuell analysiert werden, da diese Grenzfall-Resultate vom Benutzer als falsche negative Resultate interpretiert werden könnten.

Das Beispiel von Probe #7 in ***Abbildung 19*** **(unten)** illustriert einen solchen Fall. Bei der manuellen Analyse weist die Probe zwei Spitzenwerte gerade über dem Basislinien-Rauschen in ähnlichen Positionen zu den Kontrollen auf.

Es ist wichtig festzuhalten, dass die Proben #3-6 und #8-9 nicht **zwei** Spitzenwerte mit ähnlicher Amplitude in denselben Positionen wie die Kontrollen aufweisen.

Abbildung 20 zeigt denselben Probensatz in virtuellem Gelmodus analysiert und deutet auf ähnliche Weise darauf hin, dass eine Mutation in Probe #7 vorhanden ist. Wo solche Proben durch die KRAS-Analyse als SURVEYOR-Scan-negativ bewertet wurden, aber die manuelle Analyse auf das

Vorhandensein von mutationsähnlichen Spitzen hindeutet, sollte die Probe einer weiteren Analyse für Sequenzbestätigung unterzogen werden.

Anmerkung: Durch die Analyse der Probe #7 wurde bestätigt, dass diese eine G13D-Mutation enthielt (Sequenzierungsergebnisse werden in ***Abbildung 21*** *gezeigt*). .

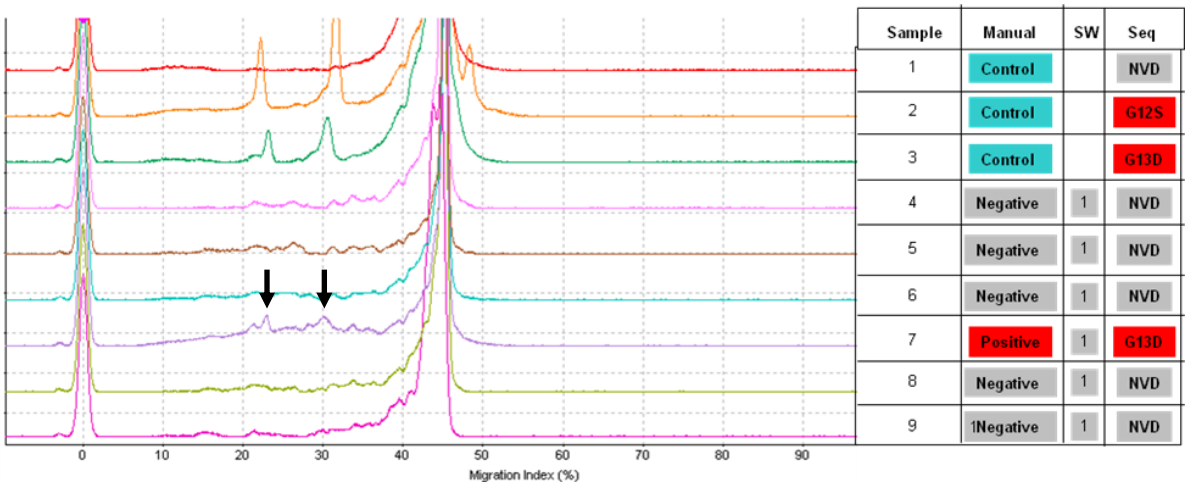


Abbildung 19: **Manuelle Analyse von Proben mit SURVEYOR Scan negativ, MCE Score = 1, Ratio ≤ 5 %**. Probe 7 zeigt mögliche SURVEYOR Nuclease-Spaltprodukte über dem Basislinien-Rauschen.

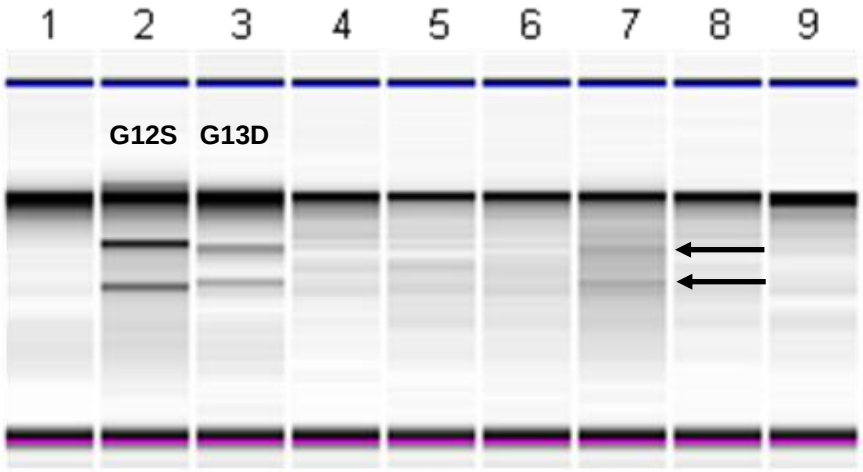


Abbildung 20: Virtuelle Gel-Analyse der Proben in Abbildung 19. Probe #7 zeigt schwache Bänder in einer ähnlichen Position zu den Kontrollproben #2 und #3, was darauf hindeutet, dass eine niedrigstufige Mutation in dieser Probe vorhanden ist.

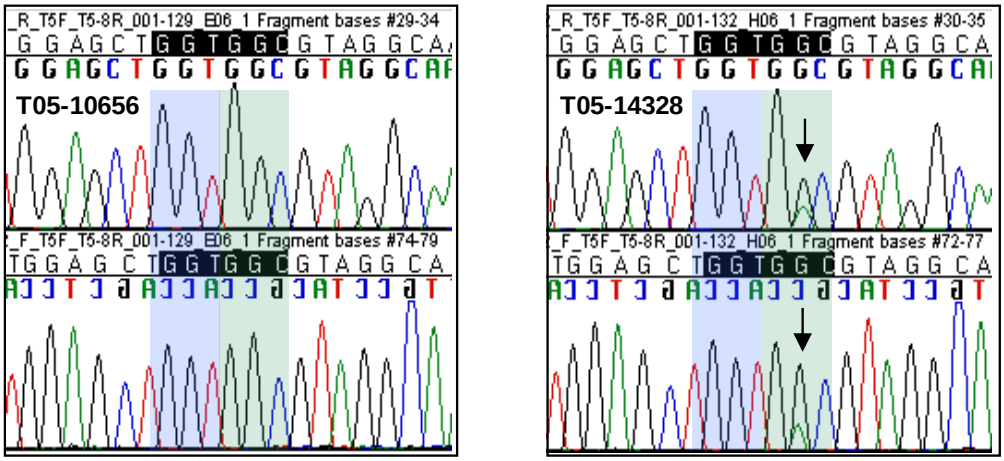


Abbildung 21: Sequenzanalyse der Proben #6 und #7 aus Abbildung 19. Die Proben #6 und #7 aus ***Abbildung 19*** wurden durch DNA-Sequenzierung weiter analysiert. Wie die manuelle Analyse der WAVE *MCE*-Spuren und die virtuelle Gelanalyse bereits vermuten ließen, handelt es sich bei Probe #6 um einen vollständigen Wildtyp, während Probe #7 eine *KRAS* G13D-Mutation enthält.

Fehlercode W-01 Manuelle Prüfung

Wenn ein **Fehlercode** W-01 von SURVEYOR Scan Aufrufen angezeigt wird, sollte der Benutzer das WAVE *MCE* Elektropherogramm und Gelbild der Probe überprüfen, um festzulegen, ob die Spitzen/Bande des oberen und unteren Markers und das ungeschnittene Homoduplex PCR Spitze/Band in den positive Kontrollen und auch den Proben angeglichen sind.

Wenn diese Spitzen/Bande korrekt angeglichen sind und die Gelbilder und Elektropherogramme der positiven Kontrollen zeigen, dass die Spitzen ein 0,6 mV Signal über dem Hintergrundpegel der Umgebungsspitzen haben, kann der Benutzer visuell die SURVEYOR Nuclease Verdauungsmuster der Proben mit denen der positiven Kontrollen vergleichen. Diese Proben, die den Verdauungsmustern der positiven Kontrollen ähnlich sind (siehe **Abbildung *18***), sollten als „positiv“ betrachtet werden und zur Sequenzbestätigung gesandt werden. Wenn der Benutzer denkt, dass eine Probe „vielleicht“ ein ähnliches Verdauungsmuster als die der positiven Kontrollen hat, sollte diese Probe als „unbekannt“ angesehen und zur Sequenzbestätigung gesandt werden.

Setzen Sie sich für jegliche Fragen in Bezug auf die **manuelle Prüfung** mit dem Transgenomic Support in Verbindung. Siehe **Kontaktdetails**.

Leistungsmerkmale

Nachweisgrenze des SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD*

Eine Validierung des SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit Exon 2 CE IVD mit dem WAVE *MCE* System mit Plasmidklonen der häufigsten KRAS Exon 2 Mutationen hat gezeigt, dass SURVEYOR Nuclease Peaks in einem Gemisch aus 2-5 % Mutant auf einem Wildtyphintergrund nachgewiesen werden können.

Die Ergebnisse unten zeigen die WAVE *MCE* System-Spuren von Verdünnungsserien für Beispielmutationen in Codon 12 und 13 und die Sequenz-Elektropherogramme der gewählten Verdünnungen.

Beachten Sie, dass die Spitzenprofile für spezifische Mutationen je nach Anzahl der Proben variieren können, die auf einem individuellen Chip liefen.

KRAS Exon 2 G12S Mutationsniveau von Ermittlungs-Verdünnungsserien

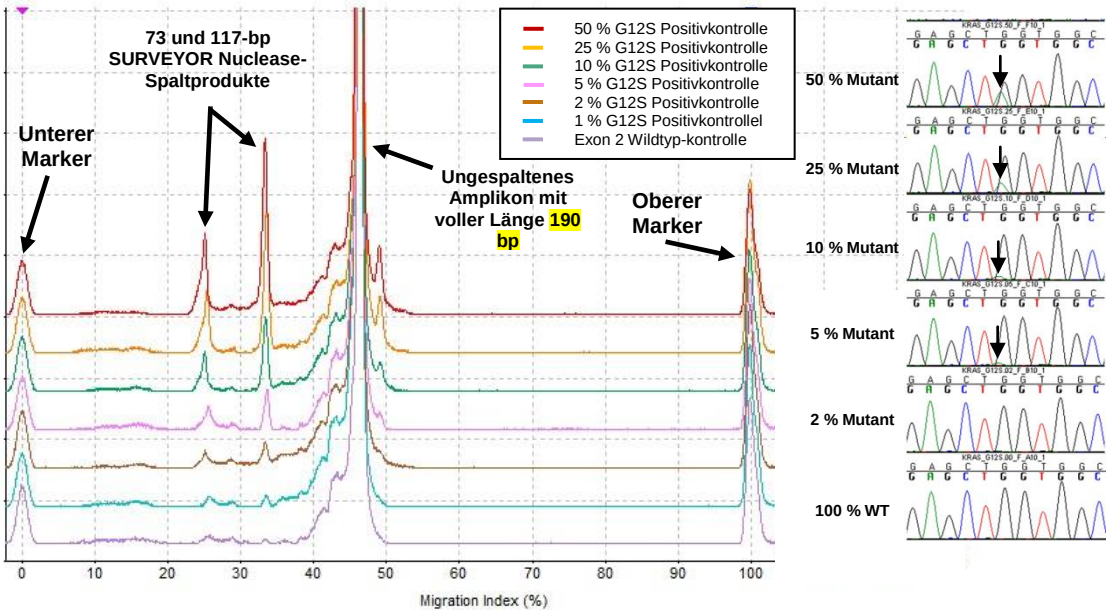


Abbildung 22: SURVEYOR Scan *KRAS* Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* Titration der KRAS Exon 2 G12S Mutation

Variierende mutante Niveaus werden durch Mischen der KRAS Control: Wild-Typ Exon 2 (PN 710141) und KRAS Positive Control Codon 12 (PN 710143) vorbereitet, dann wird das Gemisch erhitzt und abgekühlt, um Heteroduplices zu bilden. Diese Gemische werden anschließend mit SURVEYOR Nuclease gespalten und auf dem WAVE *MCE* System analysiert. **ANMERKUNG:** um einen 90 % Wildtyp, 10 % Mutant zu erzielen, muss eine Mischung aus 80 % PN 710141 und 20 % PN 710143 vorbereitet werden. Beachten Sie ferner, dass die Mehrheit des Amplikon-Gemischs aus Wildtyp-Homoduplices besteht, die nicht von der SURVEYOR Nuclease gespalten werden. Die Erfassungsgrenze des mutanten G12D-Amplikons mit SURVEYOR Nuclease+ WAVE *MCE* System beträgt 2 %.

Erfassungsgrenzen-Sequenzierungsergebnisse für die *KRAS* Exon 2 G12S Mutation

Die Elektropherogramme zeigen die DNA Sequenzierungsergebnisse für PCR Produkte, die von der SURVEYOR Nuclease analysiert wurden. Dem automatischen Sequenzierungsaufruf der Vorwärts- und auch Rückwärtsstränge gelingt es häufig nicht, G12S Mutationen auf Niveaus unter 10 % in Gemischen mit Wildtyp zu erfassen. Zusammen mit den SURVEYOR Nuclease Ergebnissen ist es möglich, die mutanten 5-10 % Sequenzierungs-Elektropherogramme für Codon 12 sicherer zu interpretieren.

Wenn eine Probenanalyse ein positives SURVEYOR Scan-Ergebnis zeigt, es aber keine durch den Gebrauch der DNA-Sequenzierung erfassbare KRAS-Mutation gibt, empfehlen wir, dass „keine Variante erfasst“ aufgezeichnet wird. Siehe „Überlegungen zum Arbeitsablauf“ für mehr Details.

KRAS Exon 2 G13D Mutationsniveau von Erfassungs-Verdünnungsserien

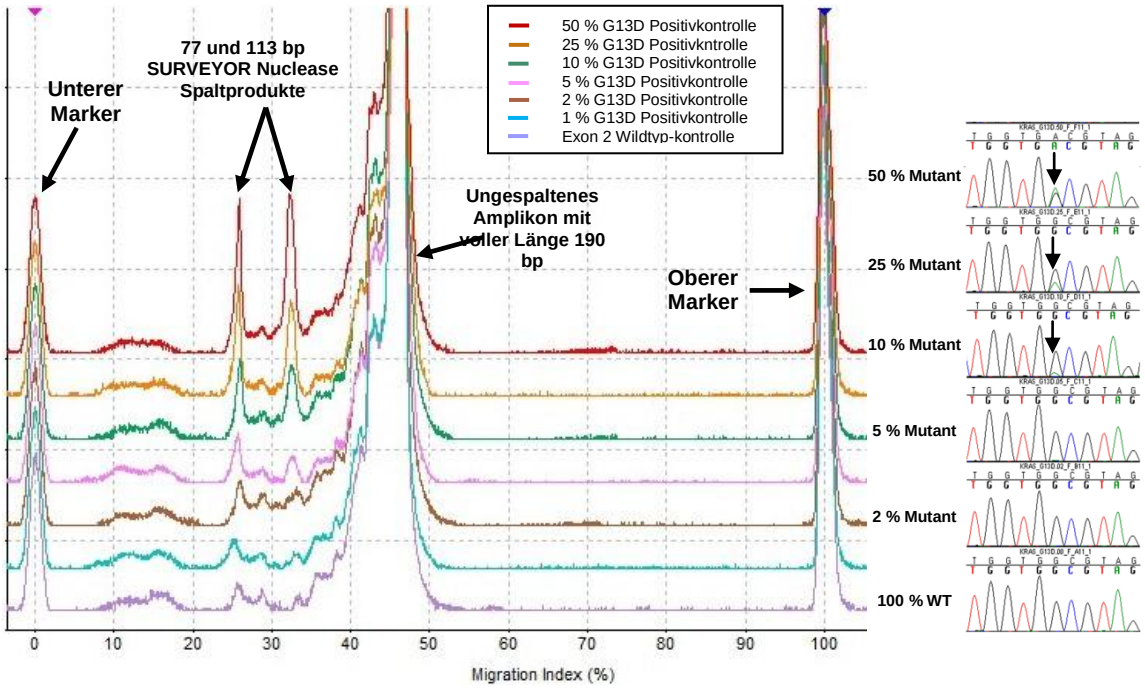


Abbildung 23: *SURVEYOR* Scan *KRAS* Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* Titration der KRAS Exon 2 G13D Mutation

Variierende mutante Niveaus werden durch Mischen der KRAS Control: Wild-Typ Exon 2 (PN 710141) und KRAS Positive Control Codon 13 (PN 710144) vorbereitet, dann wird das Gemisch erhitzt und abgekühlt, um Heteroduplices zu bilden. Diese Gemische werden anschließend mit SURVEYOR Nuclease gespalten und auf dem WAVE *MCE* System analysiert. **ANMERKUNG:** Um einen 90 % Wildtyp, 10 % Mutant zu erzielen, muss eine Mischung aus 80 % PN 710141 und 20 % PN 710144 vorbereitet werden. Beachten Sie ferner, dass die Mehrheit des Amplikon-Gemischs aus Wildtyp-Homoduplices besteht, die nicht von der SURVEYOR Nuclease gespalten werden. Die Erfassungsgrenze des mutanten G12D-Amplikons mit SURVEYOR Nuclease+ WAVE *MCE* System beträgt 5 %.

Erfassungsgrenzen-Sequenzierungsergebnisse für die *KRAS* Exon 2 G13D Mutation

Für den Vergleich werden Elektropherogramme mit den Sanger Sequenzierungsergebnissen für PCR Produkte auf den variierenden mutanten Ebenen angezeigt. Dem automatischen Sequenzierungsaufruf der Vorwärts- und auch Rückwärtsstränge gelingt es häufig nicht, G13D Mutationen auf Niveaus unter 10 % in Gemischen mit Wildtyp zu erfassen. Zusammen mit den SURVEYOR Nuclease Ergebnissen ist es möglich, die mutanten 90:10 Wildtyp- (10 % Mutation) Sequenzierungs-Elektropherogramme für Codon 13 sicherer als mutationstragend zu interpretieren.

Wenn eine Probenanalyse ein positives SURVEYOR Scan-Ergebnis zeigt, es aber keine durch den Gebrauch der DNA-Sequenzierung erfassbare KRAS-Mutation gibt, empfehlen wir, dass „keine Variante erfasst“ aufgezeichnet wird. Siehe „*Überlegungen zum Arbeitsablauf*“ für mehr Details.

Sequenzbestätigung

Führen Sie die Sequenzbestätigung durch, wenn:

1. die Sequenzidentität der *KRAS* Exon 2-Mutation erforderlich ist.
2. die Probe über eine negative SURVEYOR Scan-Bewertung mit einem MCE-Score = 1 verfügt, und manuelle Analysen nahelegen, dass SURVEYOR Nuclease-Spaltprodukte vorhanden sind.
3. die Probe einen **Fehlercode W-01** aufweist und manuelle Analysen nahelegen, dass SURVEYOR Nuclease–Spaltprodukte vorliegen.

Führen Sie die Sequenzierungsbestätigung nicht durch, wenn:

1. die Sequenzidentität der Mutation nicht erforderlich ist und ein Resultat der „*KRAS* Exon 2-Mutation“ ausreicht.
2. die Probe als SURVEYOR Scan-negativ mit einem MCE-Score = 0, Ratio = 0 bezeichnet wird.

Die in diesem Kit enthaltenen Universal Sequenzierungs-Primer sollten zur Sequenzbestätigung verwendet werden. Der Vorwärts-Primer ist PN 710153F (Universal Seq Primer 1), und der Rückwärts-Primer ist PN 710153R (Universal Seq Primer 2).

Verfahrensbeschränkungen

Von der Extraktion der formalinfixierten, paraffineingebetteten Proben übertragene Kontaminierungsstoffe können ebenfalls PCR-Amplifikations- und SURVEYOR Nuclease-Verdauungsvorgänge stören. Die in der **Qualitätskontrolle der PCR-Produkte** beschriebenen Verfahren zur Qualitätskontrolle gewährleisten, dass die extrahierte DNA zur Verwendung mit diesem Kit geeignet ist.

Dieses Kit wurde für die Verwendung mit formalinfixierten, paraffineingebetteten Biopsieproben von Kolorektaltumoren validiert. Eine Validierung für eine Verwendung mit anderen Krebsarten oder frischen bzw. tiefgefrorenen Biopsieproben besteht nicht.

Zur Fehlersuche nicht standardmäßiger Ergebnisse und Einzelheiten zu Faktoren, die diesen Test beeinträchtigen können, siehe **Anhang – Fehlersuche** weiter unten.

Bei diesem Kit muss besonders darauf geachtet werden, Übertragung und Kreuzkontamination zu vermeiden. Die hohe Empfindlichkeit der Testmethode erfordert Vorsichtsmaßnahmen für folgende Punkte:

- Achten Sie darauf, dass alle Proben so gehandhabt werden, dass eine Kreuzkontamination zwischen ihnen nicht vorkommt.
- Arbeiten Sie in einer PCR Workstation oder in einem anderen passenden Raum, wo der Arbeitsbereich vor dem Setup PCR Amplifikationsreaktionen UV-Licht ausgesetzt werden kann.
- Verwenden Sie eine getrennte PCR Workstation oder Raum, um die Proben nach der PCR Amplifikation für die Qualitätskontrolle durch Gel-Elektrophorese zu öffnen.
- Das SURVEYOR Nuclease Verdauungs-Setup sollte in einem getrennten Raum bzw. an einer anderen Workstation als der durchgeführt werden, in der das Anfangs-PCR angelegt wurde.
- Achten Sie darauf, dass bei allen Testschritten die Plasmidkontrollen des Kits von den Testproben getrennt gehandhabt werden.
    - Stellen Sie sicher, dass alle Lösungen, Nicht-Vorlage-Kontroll- und Proben-DNA-Kavitäten verschlossen waren, bevor Sie die Röhrchen mit der Kontrollplasmid-DNA öffnen.
    - BEARBEITEN SIE DIE KONTROLLEN ZULETZT. Fügen Sie den passenden Röhrchen Kontrollplasmid-DNA hinzu, NACHDEM ALLE Nicht-Vorlage-Kontroll- und Proben-Kavitäten verschlossen wurden.
    - Wischen Sie ALLE Röhrchen und Kappen nach dem Verschließen der Kontroll-DNA-Röhrchen mit einem DNA-Zerstörungsmittel ab (z.B. 10 % Bleichmittel), bevor Sie sie in einen anderen Bereich bringen.
- Achten Sie darauf, dass es beim Pipettieren in die 96-Kavitäten-Platten durch Verspritzen während des Mischens oder durch nicht gewechselte Pipettenspitzen nicht zu einer Kontamination der Proben mit angrenzenden Kavitäten kommt.

Literaturnachweis

Siehe http://www.Transgenomic.com/lib/PL/482146.pdf für Literaturnachweise über SURVEYOR Nuclease und seine Anwendungen.

Anhang

Fehlersuche

Ein effektiver Einsatz des SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD* mit dem WAVE *MCE* System hängt von der erfolgreichen Ausführung einer Anzahl von Schritten ab. Einer der entscheidendsten ist die PCR Amplifikation, die zur Produktion einer ausreichenden Menge spezifischer, gleichmäßig langer DNA führen muss, um nach der Hybridisierung und Spaltung nachgewiesen zu werden. Das wiederum hängt von der Qualität der Ausgangsprobe ab. Die Durchführung dieses Tests mit DNA, die nicht den Qualität- und Quantitätskriterien entspricht, ist nicht empfehlenswert.

Anmerkung: Wenn Sie zum ersten Mal mit SURVEYOR Nuclease arbeiten, führen Sie die Untersuchungen im Abschnitt **Verwendung der KRAS Kontrollplasmid-DNAs** durch, nachdem Sie den Abschnitt **Schritt-für-Schritt-Anleitung** gelesen und verinnerlicht haben. Bevor Sie sich an den technischen Kundendienst von Transgenomic wenden, warten Sie bitte die Ergebnisse für die KRAS Kontrollplasmid-DNAs ab.

Diese Fehlersuche deckt eine Liste von Problemen ab, die bei der Arbeit mit dem SURVEYOR Scan KRAS Mutation Detection Kit Exon 2 CE IVD mit dem WAVE *MCE* System auftreten können, sowie Vorschläge, wie sie zu lösen sind.

Konsultieren Sie das *WAVE MCE System* Bedienungshandbuch für detaillierte Anleitungen in Bezug auf den Instrumentenbetrieb und die Wartung. Das Handbuch enthält spezifische Verfahren für das Testen und die Wartung der Mikrochipleistung und beinhaltet Details zur Fehlersuche.

Problem 1 – Niedrige PCR-Ausbeute oder kein PCR-Produkt, wenn auf Agarosegel analysiert

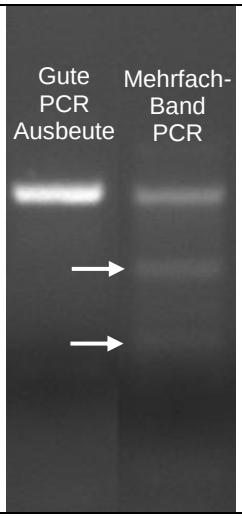
Niedrige PCR-Ausbeute	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Schlechte Qualität der DNA-Matrize	Wiederholen Sie die Aufreinigung der DNA. Überprüfen Sie die verwendete Aufreinigungsmethode. Wenn die FFPE-extrahierte DNA zu fragmentiert ist, können alternative FFPE Blocks erforderlich sein.
	Zu viel RNA in der Probe verursacht die Überschätzung der DNA-Konzentration	Wiederholen Sie die RNase Behandlung der DNA-Probe und reinigen Sie die DNA erneut
	Thermalcycler nicht kalibriert	Führen Sie die Kalibrierung des Thermalcyclers durch.
	Nicht ausreichende Matrize	Erhöhen Sie die Matrizenmenge.

Anmerkung: Es sollte hochwertige DNA aus FFPE verwendet werden. Die DNA sollte eine durch Absorption bei 260 nm gemessene Konzentration von 25 ng/µL aufweisen sowie ein Absorptionsverhältnis von 260/280 nm von größer 1,8 haben und größer als 90 % DNA sein (d. h. nahezu frei von tRNA- und rRNA-Kontamination laut Agarosegelauswertung). DNA-Proben bei einer Temperatur zwischen -20 °C und -80 °C aufbewahren.

Die Analyse von DNA-Matrize, die aus paraffineingebettetem Gewebe extrahiert wurde, erfordert mehrere Vorsichtsmaßnahmen. Die DNA kann mit Uracil-DNA-Glycosylase behandelt werden, um eine Amplifikation von DNA-Fragmenten zu vermeiden, die deaminierte C-Reste enthalten. Häufig

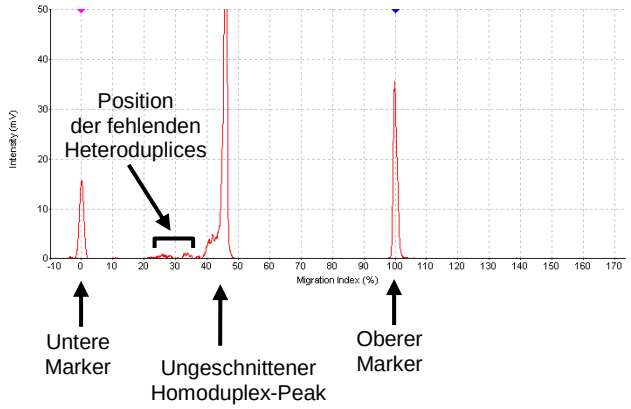
wird ein hoher Prozentsatz des aus dem paraffineingebetteten Gewebe extrahierten A260 Adsorptionsmittels bei der PCR nicht gut amplifiziert. Oft hilft eine größere Menge Start-DNA, um ein geeignetes Amplifikationsprodukt zu erhalten.

Problem 2 – Mehrere PCR-Produkte, wenn auf Agarosegel analysiert

Mehrere PCR-Produkte	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Anlagerungstemperatur zu niedrig	Überprüfen Sie die Kalibrierung des Thermalcyclers.

Anmerkung: PCR sollte einen ausreichend hohen Ertrag (größer als 20 ng/µL) einer EINZELNEN amplifizierten Species der richtigen Länge erzeugen. Für die PCR muss die in diesem Kit mitgelieferte DNA Polymerase und der DNA Polymerase 10X PCR Buffer verwendet werden. Amplikons aus Kontrollen **müssen mit der SURVEYOR Nuclease verdaut und analysiert werden, um durch Sichtprüfung der Chromatogrammprofile störendes Hintergrundrauschen auszuschließen (siehe *Ergebnisbeispiele, Abbildung 2*).** Kontrollieren Sie vor dem Verdau jedes amplifizierte DNA-Produkt durch Gelelektrophorese (oder durch die WAVE *MCE* System Analyse), um sicherzugehen, dass es eine einzelne Spezies der erwarteten Länge ist.

Problem 3 – Keine Spaltprodukte bei der Analyse nach SURVEYOR Nuclease Behandlung der Heteroduplices

Keine Spaltprodukte	**MÖGLICHE URSACHE**	**LÖSUNG**
	Anteil an Mismatch-Ziel zu gering	Test anhand der Kontrollen überprüfen.
	Ineffiziente Bildung von Heteroduplices	Führen Sie das PCR- und Hybridisierungsverfahren genau nach Anleitung durch. Verwenden Sie bei den SURVEYOR Nuclease-Verdauungen Frisch hybridisierte DNA.
	Inaktive SURVEYOR Nuclease	Führen Sie eine Reaktion mit Kontrollen durch, um die Enzymleistung zu verifizieren. Verwenden Sie nur frisch zubereitetes SURVEYOR Nuclease Master-Mix.

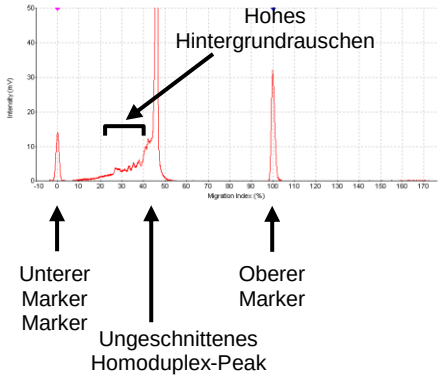
Anmerkung: SURVEYOR Nuclease spaltet überwiegend Mismatches in Heteroduplices. Das Verhältnis von Heteroduplex zu Homoduplex in der hybridisierten Probe bestimmt das Verdauungssignal in der SURVEYOR Nuclease. Wenn die *KRAS*-Mutation in einer sehr geringen Konzentration in der genomischen DNA-Probe vorliegt, kann das Signal für ein positives Ergebnis zu niedrig sein.

Es ist wichtig, darauf zu achten, dass der Hybridisierungsschritt im Thermocycler-Programm enthalten ist (siehe ***Amplifikationsprotokoll***), um die Leistung der Heteroduplexbildung zu optimieren. Heteroduplices werden bei Standard-PCR-Reaktionen mit sehr geringem Ertrag gebildet.

Anmerkung: Der Signal-Rausch-Abstand ist im Allgemeinen hoch genug, um Mutationen mit einem geringeren Prozentsatz der Gesamt-DNA-Matrize nachzuweisen. Es ist möglich, bis 2 % mutante DNA zu detektieren. Die **Abbildungen *19-20*** zeigen die Detektion der Mutationen *KRAS* Exon 2 Codon 12 und 13 (4-10 % Heteroduplex) mit einem WAVE *MCE* System. **Abbildung *2*** zeigt die mit Homoduplex und Heteroduplex *KRAS* Positivkontroll-DNAs (in diesem Kit enthalten) generierten Verdauungsprodukte auf einem WAVE *MCE* System. Die mutationsspezifischen Schaltprodukte sind deutlich als zwei neue Peaks zu erkennen, die mit der erwarteten Länge eluiert wurden, die anhand des DANN-Längenstandards berechnet werden können.

Achtung: Im Handel erhältliche PCR-Puffer variieren extrem in ihrer Zusammensetzung, und die Zubereitungen werden durch den Hersteller oft nicht genau bezeichnet. Mehrere Puffer sind aufgrund von pH oder Zusatzstoffen, Tensiden oder anderen herstellereigenen Inhaltsstoffen mit der SURVEYOR Nuclease **NICHT** kompatibel. **Verwenden Sie KEINE andere als die im Kit enthaltenen (n) Polymerase oder 10X Polymerase-Puffer.**

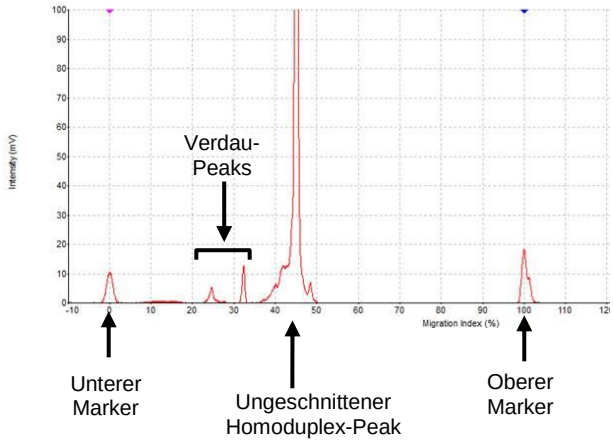
Problem 4 – Hohes Hintergrundrauschen nach SURVEYOR Nuclease-Behandlung

Hohes Hintergrundrauschen	MÖGLICHE URSACHE	LÖSUNG
	Nicht optimaler Hybridisierungsschritt	Führen Sie folgende Schritte durch: 1. Vergewissern Sie sich, dass sich die DNA-Konzentration im Bereich >25 ng/µL befindet. 2. Wiederholen Sie den Hybridisierungsschritt und achten Sie dabei darauf, den Hybridisierungsprozess genau einzuhalten.
	DNA-Menge zu niedrig	Überprüfen Sie die Ergiebigkeit und Qualität der DNA-Matrize
	Nicht-spezifische PCR-Produkte	Überprüfen Sie Ergiebigkeit und Qualität
	SURVEYOR Enhancer W2 und/oder SURVEYOR Enhancer Cofactor wurden deaktiviert	Überprüfen Sie das Ablaufdatum des Kits.

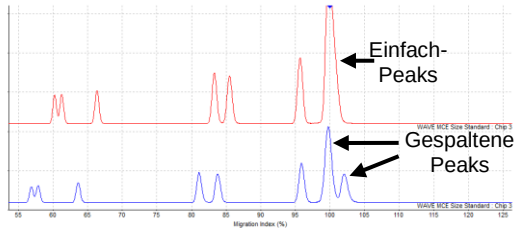
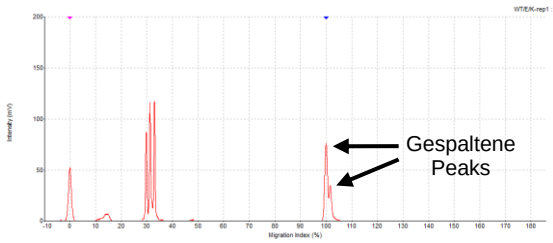
Hinweis: Die SURVEYOR Nuclease schneidet gelegentlich bei doppelsträngigen DNAs bei zufällig ausgewählten Gen-Orten ein. Dies erzeugt nach der Verdauung ein Hintergrundrauschen. Diese Aktivität wird durch den SURVEYOR Enhancer W2 und seinen Kofaktor unterdrückt, ohne ansonsten die Mismatch-Spaltreaktionen negativ zu beeinträchtigen. SURVEYOR Enhancer W2 und SURVEYOR ENHANCER Cofactor sind in diesem Kit enthalten und sollten immer verwendet werden.

Wenn dieses Anschneiden weiter eintritt werden kleine Peaks auf dem WAVE *MCE* System erzeugt. Durch Vergleich des Kontrollverdaus von Homoduplices mit dem Probenverdau können diese erkannt und mit der WAVE *MCE* System Software normalisiert werden.

Problem 5 – Peaks des SURVEYOR Nuclease-Verdaus bei Negativkontrollen

Verdauungs-Peaks bei Negativkontrollen	**MÖGLICHE URSACHE**	**LÖSUNG**
	Kontamination von Kit-Inhalten mit *KRAS*-Amplikonen oder Plasmid-Kontrollen.	Entsorgen Sie alle Kit-Komponenten und benutzen Sie ein neues Kit. Kontaktieren Sie den Technischen Kundendienst von Transgenomic, um potenzielle Ursachen und Quellen der Kontamination zu besprechen.

Problem 6 – Aufspaltung des oberen Markers (UM = Upper Marker) bei der Analyse von Leitern oder Proben

Der obere Marker (UM) beginnt , sich als zweiter Peak zu lösen oder sich in einen Doppel-Peak aufzuspalten	**MÖGLICHE URSACHE**	**LÖSUNG**
 Peak-Aufspaltung eines WAVE MCE Size Standard im Vergleich zu einem normalen Größen-Standard.  Probenanalyse mit der Peak-Aufspaltung des oberen Markers.	Für gewöhnlich durch Verwendung von altem (oder beeinträchtigtem) Trennpuffer oder abgelaufenen Reagenzien verursacht.	Stoppen Sie den Durchlauf, bereiten Sie einen frischen Trennpuffer zu und starten Sie den Durchlauf erneut. Bereiten Sie vor der Analyse immer frische Reagenzien vor. Verwenden Sie zur Erzielung optimaler Resultate die Trennpuffer/Färbungsreagenz-Mischung innerhalb von 4 Stunden ab der Zubereitung. Anmerkung: Die Peak-Aufspaltung kann zu einem Fehler bei der Fragmentgrößenberechnung für den Größen-Standard führen, wodurch eine manuelle Einstellung des oberen Markers erforderlich sein kann.

Problem 7 – Fehlercodes in WAVE *MCE* Viewer für SURVEYOR Call Software

Bei der Verwendung des WAVE *MCE* Viewer für die SURVEYOR Call Software können Fehlercodes wie die in ***Abbildung 24*** angezeigten auftreten. Siehe untenstehende Tabelle für eine Erklärung der Fehlermeldungen und entsprechende Abhilfemaßnahmen.

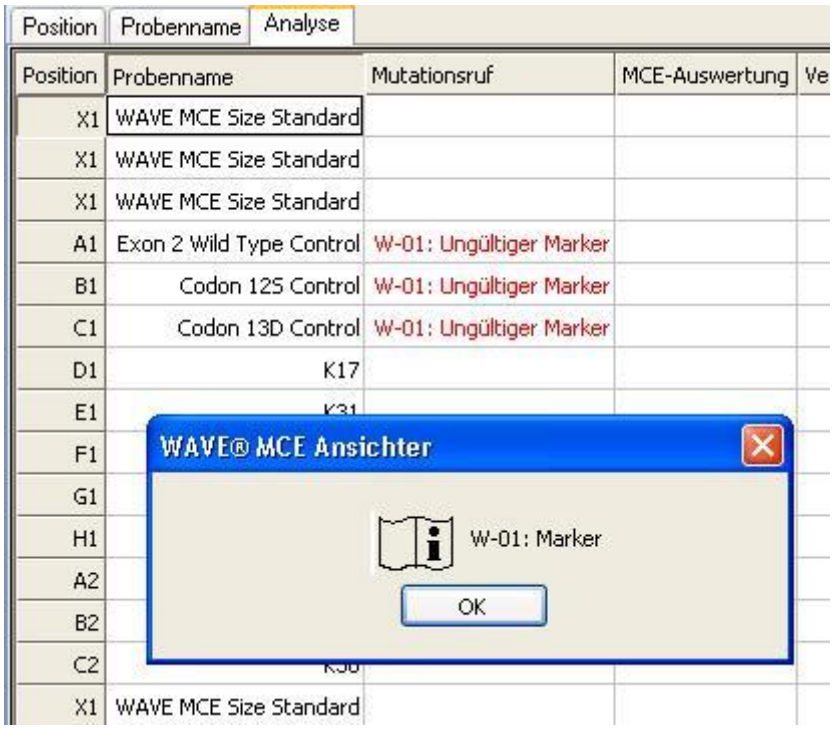


Abbildung 24: Beispiel für eine Fehlermeldung mit dem Fehlercode W-01.

Tabelle: WAVE *MCE* Software Fehlercode-Meldungen

Code	Meldung	Erklärung der Meldung	Maßnahmen zur Fehlerbehebung
W-01	Ungültiger Marker	Die **Marker-Peaks** für die Kontrolle <Name> verfügen über eine ungeeignete Größe und/oder Position innerhalb des Elektropherogramms. Die Analyse kann für diese Probe nicht fortgeführt werden.	Überprüfen Sie das WAVE *MCE* System, indem Sie die Gerätefunktion Analyseleistung überprüfen ausführen. Sehen Sie auch nochmals im Abschnitt „Manuelle Überprüfung von WAVE *MCE* Gel-Bildern und Elektropherogrammen“ nach, um die Resultate manuell auszuwerten bzw. im Anschluss daran im Abschnitt “SURVEYOR Scan-Aufruf-Verfahren” Schritt 8g, um einen Aufruf zu verändern, falls einer der beiden Marker die Kriterien für den SURVEYOR Scan-Aufruf nicht erfüllt.
W-02	Ungültige Leiter	Der als **Leiter** verwendete Größenstandard entsprach den Betriebsparametern nicht. Die Analyse kann nicht durchgeführt werden.	Überprüfen Sie die ordnungsgemäße 10-fache Verdünnung des WAVE *MCE* Optimized Size Standard.
W-03	Ungültige WT-Kontrolle	Der/die Peak(s) für die **Exon 2 WildTyp-Kontrolle** eignet/eignen sich nicht für die Analyse. Er verfügt entweder über einen untypischen Peak oder Migrationsindex. Es kann keine *KRAS*-Analyse der Proben durchgeführt werden.	Überprüfen Sie das Gerät und sonstige Kontrollvorrichtungen. Falls dies zu keinem Ergebnis führt, wiederholen Sie PCR und den SURVEYOR Nuclease-Verdau.

Code	Meldung	Erklärung der Meldung	Maßnahmen zur Fehlerbehebung
W-04	Ungültige Positivkontrolle	Die Peaks der **Codon 12 Positivkontrolle** verfügen entweder über eine ungeeignete Trennung oder Peakhöhe bzw. über einen ungeeigneten Migrations-Index. Es kann keine *KRAS*-Analyse von Exon 2 durchgeführt werden.	Überprüfen Sie das Gerät und sonstige Kontrollvorrichtungen. Falls dies zu keinem Ergebnis führt, wiederholen Sie PCR und den SURVEYOR Nuclease-Verdau.
W-05	Ungültige Positivkontrolle	Die Peaks der **Codon 13 Positivkontrolle** verfügen entweder über eine ungeeignete Trennung oder Peakhöhe bzw. über einen ungeeigneten Migrations-Index. Die KRAS-Analyse kann nicht durchgeführt werden.	Überprüfen Sie das Gerät und sonstige Kontrollvorrichtungen. Falls dies zu keinem Ergebnis führt, wiederholen Sie PCR und den SURVEYOR Nuclease-Verdau.
W-08	Ungültige Probe	Der ungeschnittene Peak für die Probe verfügt entweder über eine untypische Peak-Höhe oder einen untypischen Migrationsindex. *KRAS*-Analyse erfüllt nicht alle Kriterien für „Keine Variante festgestellt“ (No Variant Detected).	Überprüfen Sie das Gerät und sonstige Kontrollvorrichtungen. Falls dies zu keinem Ergebnis führt, überprüfen Sie, ob ein geeignetes Muster für PCR vorhanden ist. Wiederholen Sie gegebenenfalls PCR und SURVEYOR Nuclease-Verdau.
W-09	**Fehlende Kontrolle -** Exon 2-Wildtyp	**Wildtyp-Kontrolle Exon 2** fehlt auf der Proben-Platte. Die KRAS-Analyse kann nicht durchgeführt werden.	Fügen Sie eine Wildtyp-Kontrolle für Exon 2 ein und wiederholen Sie die Analyse.
W-10	**Fehlende Kontrolle** - Codon 12	**Die Positivkontrolle für Exon 2 Codon 12** fehlt auf der Probenplatte. Die KRAS-Analyse kann nicht durchgeführt werden.	Fügen Sie eine Wildtyp-Kontrolle für Codon 12 von Exon 2 ein und wiederholen Sie die Analyse.
W-11	**Fehlende Kontrolle** - Codon 13	**Die Positivkontrolle für Exon 2 Codon 13** fehlt auf der Probenplatte. Die KRAS-Analyse kann nicht durchgeführt werden.	Fügen Sie eine Wildtyp-Kontrolle für Codon 13 von Exon 2 ein und wiederholen Sie die Analyse.
W-14	**Fehlende Leiter**	Es ist kein Leiter-Durchlauf (Größenstandard) vorhanden. Die KRAS-Analyse kann nicht durchgeführt werden.	Fügen Sie einen ordnungsgemäß verdünnten WAVE *MCE* Optimized DNA Size Standard für die Leiter hinzu und wiederholen Sie die Analyse.

Einzelheiten zur Bestellung

Produktnummer	Produktname	Größe
710105-CEIVD	SURVEYOR Scan *KRAS* Mutation Detection Kit *Exon 2 CE IVD*	100 Analysen
MCE-99-2020B	WAVE *MCE* MicroChip Electrophoresis System	Einzeln
MCE-99-3600	WAVE *MCE* Optimized Microchip	Einzeln
MCE-99-5000	WAVE *MCE* Optimized Separation Buffer Kit	~1.000 Analysen
MCE-99-5500	WAVE *MCE* Optimized Marker Kit	~1.000 Analysen
MCE-99-5600	WAVE *MCE* Optimized Cleaning Reagents Kit	1 Kit

Kontaktdaten

Unternehmenszentrale

Transgenomic, Inc.
12325 Emmet Street
Omaha,
Nebraska 68164
USA

Tel.: +1 (402) 452-5400
Fax: +1 (402) 452-5401

E-Mail: SURVEYORscan@Transgenomic.com

Europa

Autorisierte EU-Vertretung

Transgenomic Limited
40 Watt Road, Hillington Park, Hillington
Glasgow G52 4RY
Großbritannien

Tel.: +44 141 892 8800
Fax: +44 141 883 5967

E-Mail: SURVEYORscan@Transgenomic.com

ISO 9001:2008-Zertifizierung

Transgenomic, Inc. wendet ein Qualitäts-Managementsystem an, das den Anforderungen von ISO 9001:2008, wie vom BSI zertifiziert, entspricht (Zertifizierung # FM 538914).

www.Transgenomic.com

Transgenomic®
Advancing Personalized Medicine

Lizenzen, Handelsmarken & Copyright

SURVEYOR Nuclease: Dieses Produkt wurde unter exklusiver Lizenz der US-Patente 6,699,980, 6,391,557, 5,869,245, ihrer ausländischen Entsprechungen und weiterer anhängiger Patente hergestellt. Für die Verwendung von SURVEYOR Nuclease ist eine Lizenz von Transgenomic erforderlich. Wissenschaftsorganisationen, nicht gewinnorientierte und gewinnorientierte Organisationen und Unternehmen verfügen mit dem Kauf dieses Produkts über beschränkte Rechte zur Verwendung von SURVEYOR Nuclease für Forschungszwecke. Ein Weiterverkauf bzw. eine anderweitige Verwendung sind streng verboten. Bitte kontaktieren Sie Transgenomic für weitere Informationen.

DNA Polymerase: Die Verwendung dieses Produkts ist durch eine oder mehrere der folgenden US-Patente sowie zugehörige Patentansprüche außerhalb der USA geschützt: 5,789,224, 5,618,711, 6,127,155 sowie Ansprüche außerhalb der USA zugehörig zu US-Patent Nr. 4,889,818. Der Kauf dieses Produkts schließt ein eingeschränktes, nicht übertragbares Nutzungsrecht dieses Produkts für den eigenen unternehmensinternen Forschungszweck des Käufers ein. Mit Ausnahme der Ihnen gewährten beschränkten Lizenz werden Ihnen an Patenten (wie den Patentansprüchen für das 5. Nuclease-Verfahren in den US-Patenten 5,210,015 und 5,487,972) keinerlei weiteren Rechte zur Anwendung einer der patentierten Methoden und zur Erbringung gewerblicher Dienstleistungen welcher Art auch immer (einschließlich und ohne Beschränkung der Berichterstattung über die Resultate der Tätigkeiten des Käufers für eine Gebühr oder eine sonstige wirtschaftliche Gegenleistung) gewährt, und zwar gleich ob ausdrücklich, stillschweigend oder durch Klagehemmung. Dieses Produkt dient ausschließlich Forschungszwecken. Für die diagnostische Verwendung, für welche die Roche-Patente gelten, ist eine separate Lizenz von Roche erforderlich. Weitere Informationen über den Erwerb von Lizenzen können Sie erhalten, indem Sie den Leiter der Abteilung für Lizenzierung, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA kontaktieren.

Transgenomic, SURVEYOR und WAVE sind eingetragene Warenzeichen, und das Helix-Logo und Advancing Personalized Medicine sind Warenzeichen für Transgenomic, Inc. Alle anderen Warenzeichen sind Warenzeichen ihrer jeweiligen Eigentümer.

© 2012 Transgenomic, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Gedruckt in den USA.

Dokumentteilnr. 482356-03(DE)